

Produktion eines natürlichen Aromas

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

dem Fachbereich Biologie und Chemie

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Diplom Chemiker Michael Goldmann

geboren am 16. Juni 1983 in Fulda, Deutschland

2018

Dekan: Prof. Dr. Jürgen Janek

1. Gutachter: Prof. Dr. Holger Zorn

Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie

Justus-Liebig-Universität Gießen

2. Gutachter: Prof. Dr. Richard Göttlich

Institut Organische Chemie

Justus-Liebig-Universität Gießen

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die vorgelegte Thesis selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Thesis angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Thesis erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Ort, Datum

Michael Goldmann

Veröffentlichungen

Preparative aerobic oxidations with basidiomycetous enzymes: CH-functionalization of adamantane; T.S. Zhuk, M. Goldmann, J. Hofmann, J.C.S. Pohl, H. Zorn, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, Vol.122 (2015), 87-92

DOI: 10.1016/j.molcatb.2015.08.002

Biotechnological production of methyl-branched aldehydes; M.A. Fraatz, M. Goldmann, T. Geissler, E. Gross, M. Backes, J.M. Hilmer, J. Ley, J. Rost, A. Francke, H. Zorn, Journal of Agriculture and Food Chemistry, Vol 66, (2018), 2387-2392

DOI: 10.1021/acs.jafc.6b04793

Patent

H. Zorn H, M.A. Fraatz, M. Goldmann, J. Rost, F. Hentschel, E. Gross, J. Ley, K. Geißler, T. Geißler, E. Backes, J-M. Hilmer (2017) Biotechnologische Darstellung von natürlichem 12-Methyltridecanal;

Publication number WO2017088937 A1

Notifying number PCT/EP2015/077992

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Professor Dr. Holger Zorn für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die Bereitstellung des interessanten Themas und die Betreuung danken.

Ein großer Dank gilt meiner Familie, welche mich immer besonders unterstützt hat.

Nicht zu vergessen sind außerdem Nadja Kreuter, Benjamin Hucke, Florian Birk, Julia Hofmann und Professor Dr. Rahman Hosseinzadeh, welchen ich ganz besonders für den regen Austausch und ihre Hilfe danke.

Inhaltsverzeichnis

Selbstständigkeitserklärung	II
Veröffentlichungen	III
Patent	III
Danksagung	IV
Abkürzungsverzeichnis	VIII
Einleitung und Aufgabenstellung	1
1.1 Rechtliche Grundlagen	1
1.2 12-Methyltridecanal	2
1.3 Biokatalysatoren und Biotransformation	2
1.4 Biotechnologische Darstellung von Aldehyden	2
1.5 Enzyme	3
1.6 α -Dioxygenase	3
1.7 Carbonsäure-Reduktase (CAR)	5
1.8 Aufgabenstellung	7
2.1 Material & Methoden	8
2.2 Geräte	8
2.3 Chemikalien	10
2.4 Fettsäuren und Aldehyde	13
2.5 Mikroorganismen	13
2.6 Plasmide	14
2.6.1 Plasmide DOX	14
2.6.2 Plasmide CAR	17
2.7 Kulturführung <i>E. coli</i>	19
2.7.1 Vorkulturführung <i>E. coli</i>	19
2.7.2 Stammhaltung von <i>E. coli</i>	20
2.8 Expressionskulturen der <i>E. coli</i> -Stämme	21
2.8.1 <i>E. coli</i> Stämme mit DOX codierenden Plasmiden	21
2.8.2 <i>E. coli</i> Stämme mit CAR codierenden Plasmide	22
2.8.3 Isolierung der CAR	22
2.8.4 Optimierung der Isolierung der CAR zwecks Bilanzierung der Ansätze	23
2.8.5 Bestimmung der Proteinkonzentration	23

2.9	Transformation	23
2.10	Transformation von pET28a(+) mit und ohne DOX in <i>E. coli</i> - Zellen.....	23
2.10.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	24
2.10.2	Probenvorbereitung	26
2.10.3	Probenlauf	26
2.10.4	Coomassiefärbung.....	26
2.11	Enzymatische Umsetzungen.....	27
2.11.1	Enzymatische Oxidation mittels DOX	27
2.11.2	Enzymatische Reduktion mittels Carbonsäure-Reduktase	28
2.11.3	Quantifizierung der Umsetzung	31
2.11.4	Synthese der Standards	31
2.11.5	Bilanzierung der enzymatischen Umsetzung mittels CAR.....	35
2.11.6	Kinetik der enzymatischen Umsetzung von 12-MTS mittels CAR	36
2.11.7	Bestimmung der Aktivität mittels NADPH-Assay	36
2.11.8	Untersuchung der Aktivität und der Spezifität der Lipase aus <i>Candida rugosa</i>	37
2.11.9	Umsetzung des Lipidextraktes aus <i>Conidiobolus heterosporus</i>	41
2.11.10	Gaschromatographie	46
2.12	Entsorgungshinweis	51
2.12.1	Biologisches Material.....	51
Ergebnisse.....		52
2.13	Expressionskulturen der <i>E. coli</i> -Stämme.....	52
2.13.1	<i>E. coli</i> -Stämme mit DOX codierenden Plasmiden	52
2.13.2	<i>E. coli</i> -Stämme mit CAR codierenden Plasmiden.....	52
2.13.3	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	53
2.14	Transformation der Plasmide	54
2.14.1	Transformation von pET28a(+) mit und ohne DOX in <i>E. coli</i> -Zellen..	54
2.15	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	55
2.15.1	SDS-PAGE der DOX	55
2.15.2	SDS-PAGE der CAR	57
2.16	Enzymatische Umsetzungen.....	59
2.16.1	Enzymatische Oxidation mittels α -Dioxygenase.....	59
2.16.2	Olfaktorische Messung	62
2.16.3	Enzymatische Umsetzung mittels CAR	63

2.16.4	Funktionstest	63
2.16.5	Bilanzierung der enzymatischen Umsetzung mittels CAR	66
2.16.6	Bestimmung der Responsefaktoren.....	67
2.17	Ganzzellkatalyse der CAR-exprimierenden <i>E. coli</i> -Stämme	68
2.17.1	Kinetik der Ganzzellkatalyse.....	68
2.17.2	Blindwerte der Ganzzellkatalyse.....	71
2.17.3	Blindwerte der Ganzzellkatalyse des <i>E. coli</i> -Stammes mit pET-28a..	71
2.18	Umsetzung mit isoliertem Enzym	73
2.18.1	Bilanzierung der Umsetzung mittels isolierter CAR	73
2.18.2	Blindwerte der Umsetzung mittels isolierter CAR	76
2.18.3	Kinetik der Umsetzung mittels isolierter CAR	77
2.18.4	Bestimmung der Aktivität der CAR mittels NADPH-Assay.....	80
2.19	Experimente mit Lipidextrakt aus CHET-N.....	81
2.20	Untersuchung der Aktivität und der Spezifität der Lipase aus <i>Candida rugosa</i>	81
2.20.1	Isolierung der Lipide	82
2.20.2	Bestimmung der Fettsäuremethylesterverteilung (FSME) des Lipidextraktes von CHET-N.....	82
2.20.3	Umsetzung des Lipidextraktes aus CHET-N mittels isolierter CAR ...	83
2.20.4	Blindwerte der Umsetzung des Lipidextraktes.....	86
2.20.5	Bestimmung der frei vorliegenden Fettsäuren	86
	Diskussion	89
	Zusammenfassung und Ausblick.....	105
	Literatur	108
	Anhang	119

Abkürzungsverzeichnis

DOX	α -Dioxygenase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaare
dd H ₂ O	bidestilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E-Tube	Eppendorf-Tube
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GC	Gaschromatograph
GC-FID	Gaschromatograph- Flammenionisationsdetektor
GC-MS	Gaschromatograph-Massenspektrometer
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kbp	kilo Basenpaare
MEK	Methylethylketon

Na-Acetat	Natriumsalz der Essigsäure
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
PAP	Probenauftragspuffer
RNAse	Ribonuklease A
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid- Gelelektrophorese
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE-Puffer	Tris-EDTA Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser

Einleitung und Aufgabenstellung

Seit der Frühzeit der menschlichen Geschichte sind verschiedene Gewürze und Extrakte genutzt worden, um die Nahrungsmittel schmackhafter zu machen – sie zu aromatisieren. Eine entscheidende Rolle spielte auch die Nutzung von biotechnologischen Verfahren, hierfür wurden bereits 3500 v. Chr. biotechnologische Prozesse genutzt. So zum Beispiel wurde sowohl von den Ägyptern um 3500 v. Chr. Wein zubereitet, als auch 500 Jahre später, von den Babyloniern, aus Brot und Gerste Bier hergestellt.

Das Wort „Aroma“ kommt aus dem Griechischen und bedeutet „Gewürz“, wobei Geruchsstoffe heute in vielen Bereichen des alltäglichen Lebens von herausragender Bedeutung sind. Bedingt durch steigenden Nahrungsmittelbedarf werden Alternativen zu bisherigen, traditionellen Quellen für Aromastoffe gesucht. Im Jahr 2100 sollen laut Schätzungen der United Nations (World Population Prospects 2015 Revision) 11,2 Milliarden Menschen auf der Erde leben. Somit ist es ratsam, neue Möglichkeiten in Betracht zu ziehen, sowohl den Bedarf an Nahrungsmitteln zu decken, als auch deren gleichbleibende Qualität und Geschmack zu gewährleisten. Eine Verknüpfung von proteinreicher Nahrung mit der Möglichkeit, diese durch Aromen schmackhafter zu machen, könnte ein neuer Weg für eine alternative Ernährung sein.

1.1 Rechtliche Grundlagen

Die rechtlichen Anforderungen an einen natürlichen Aromastoff wurden vom europäischen Parlament und dem Rat im Dezember 2008 in der Verordnung (EG) Nr. 1334/2008 festgehalten. Ein „natürlicher Aromastoff“ ist eine Substanz, welche „durch geeignete physikalische, enzymatische oder mikrobiologische Verfahren aus pflanzlichen, tierischen oder mikrobiologischen Ausgangsstoffen gewonnen, die als solche verwendet oder mittels eines oder mehrerer der in Anhang II aufgeführten herkömmlichen Lebensmittelzubereitungsverfahren für den menschlichen Verzehr aufbereitet werden. Natürliche Aromastoffe sind Stoffe, die natürlich vorkommen und in der Natur nachgewiesen wurden.“

Des Weiteren ist in der Verordnung (EG) Nr. 1829/2003 des europäischen Parlamentes und des Rates vom 22. September 2003 über gentechnisch veränderte

Lebensmittel und Futtermittel (Erwägungsgrad 16 und Art 2 §6) festgehalten, dass der Einsatz von gentechnologischen Methoden zur Produktion von Aromastoffen nicht deklarationspflichtig ist, sofern diese „mit Hilfe“ gentechnisch veränderter Organismen hergestellt wurden.

1.2 12-Methyltridecanal

12-Methyltridecanal wurde mit einem talgigen und fleischigen Geruch als charakteristisches Aroma von gedünstetem Rindfleisch nachgewiesen. Da es bisher nicht in rohem Fleisch identifiziert werden konnte, kam es zur Hypothese, dass die Freisetzung aus den Lipiden durch Hitzeeinwirkung ausschlaggebend sei (Mottram 1998). Der Geruchsschwellenwert von 12-Methyltridecanal ist sehr niedrig und liegt bei 0,1 µg/kg in Wasser, wobei das Aroma hauptsächlich in erhitztem Rindfleisch (44-63 µg/g Lipid), kaum in Lammfleisch (14 µg/g Lipid) und minimal in Hühnchenfleisch (0,3 µg/g Lipid) vorkommt (Guth und Grosch 1993).

Bisher ist es nur möglich gewesen, dieses charakteristische Aroma durch chemische Synthese zu produzieren (Yuasa und Haruki 2004).

1.3 Biokatalysatoren und Biotransformation

Biokatalysatoren können komplexe Moleküle, wie zum Beispiel Enzyme, oder auch komplette Mikroorganismen sein. Diese Biokatalysatoren können durch Absenken der Aktivierungsenergie Umsetzungen von Substanzen beschleunigen. Sie werden von Hefen, Pilzen und Bakterien hergestellt, aus welchen die katalytisch aktiven Moleküle isoliert werden können. Ebenso finden aber auch komplette Zellen, entweder als lebender Organismus oder als Lyophilisat, Verwendung.

Von gesteigertem Interesse in der Industrie sind isolierte Enzyme, da hier weniger unerwünschte Nebenreaktionen stattfinden können. Ebenso werden aber auch komplette Zellen verwendet, wenn zum Beispiel für die katalysierte Reaktion Cofaktoren notwendig sind. *In vitro* Regenerierung der Cofaktoren ist im Allgemeinen möglich, jedoch ist es ökonomischer, diese von Zellen wieder regenerieren zu lassen. (Hudlicky und Reed 2009) (de Carvalho 2011)

1.4 Biotechnologische Darstellung von Aldehyden

Die biotechnologische Gewinnung von Aroma-relevanten Aldehyden aus Fettsäuren oder Lipidextrakten ist eine oft genutzte Methode. So zum Beispiel konnten mittels Inkubation von Ölen mit Lipoxygenasen C₆-C₁₀-Aldehyde generiert werden (Kerler, et

al. 2005) und Alkohole durch Einsatz einer Alkohol-Oxidase (Gabelman und Luzio 1998) oder Säuren durch bestimmte Reduktasen zu den jeweiligen Aldehyden umgesetzt werden (Binder 2009) (He, Li, et al. 2004) (Akhtar, Turner und Jones 2013). Weitere Ansätze verfolgen die Nutzung von Sauerstoff als Co-Substrat bei der Biotransformation von Säuren mittels α -Dioxygenase (DOX) (Shine und Stumpf 1973) (Kaehne, Buchhaupt und Schrader 2011).

1.5 Enzyme

Enzyme sind Biokatalysatoren, welche Substrate chemisch verändern. Die dafür nötige Reaktion wird durch Absenken der Aktivierungsenergie im aktiven Zentrum des Enzyms begünstigt. Das aktive Zentrum verbindet sich mit dem Substrat und bildet einen Enzym-Substrat-Komplex aus, welcher durch das Schlüssel-Schloss-Prinzip bzw. das *induced-fit*-Modell beschrieben wird. Bei Enzymen handelt es sich um Proteine, die von lebenden Zellen auf Basis der Gensequenz exprimiert werden, um essentielle biochemische Prozesse in den Zellen zu katalysieren. Enzymkatalysierte Reaktionen finden meist bei wenig variablen pH-Werten und Temperaturen statt, laufen dafür jedoch hochselektiv und besonders schnell ab. Aufgrund umweltfreundlicher und nicht-toxischer Produktionsprozesse steigt das Interesse an der Biokatalyse stetig an (Hollmann, et al. 2011) (Clark 2009).

1.6 α -Dioxygenase

α -Dioxygenasen (DOX) benötigen für die Umsetzung einer Fettsäure zu einer 2-Hydroperoxid-Fettsäure Sauerstoff als Cosubstrat. Die Hydroperoxid-Fettsäure zerfällt dann spontan, unter Wasser- und Kohlenstoffdioxid-Abspaltung, zu dem um ein Kohlenstoffatom verkürzten Aldehyden (vgl. Abbildung 2). Es handelt sich um ein monomeres Enzym mit einer Häm-Gruppe (Galliard und Matthew 1976) (Hamberg, Sanz und Castresana 1999) (Saffert, et al. 2000) (T. Koeduka, K. Matsui und Y. Akakabe, et al. 2000). Das Enzym konnte u.a. in Gurken, Kresse, Tabak, Erbsen und Reis nachgewiesen werden. In Reis konnte keine Enzymaktivität nachgewiesen werden, welche unerwünschte Nebenprodukte generiert. (Koeduka, Matsui und Akakabe 2002)



Abbildung 1: 3D-Struktur der DOX aus Reis (*Oryza sativa*) (NCBI, Referenz Sequenz: NP_001066718.1)

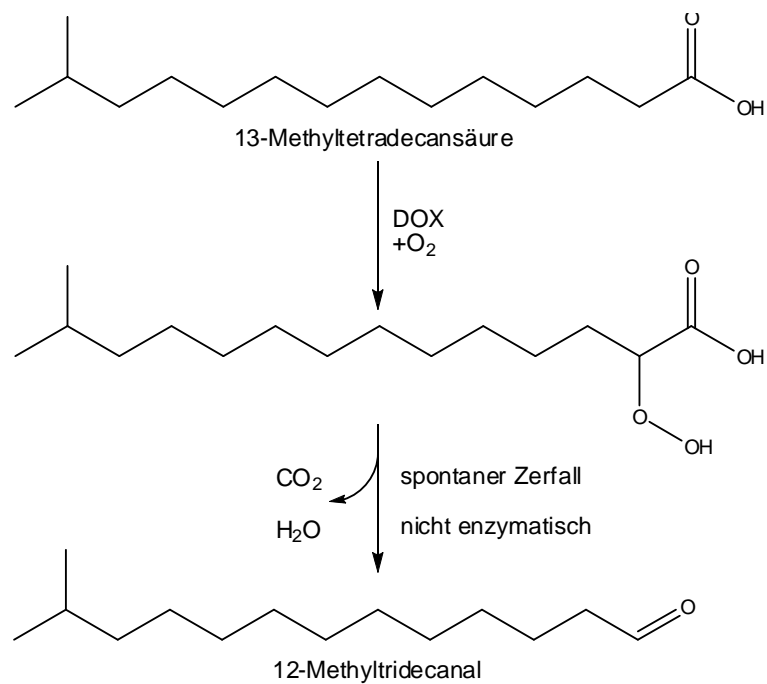


Abbildung 2: Reaktionsmechanismus der DOX am Bsp. der Reduktion von 13-Methyltetradecansäure zu 12-Methyltridecanal, nach Hamberg et al.; Koeduka et al. (1999, 2000)

1.7 Carbonsäure-Reduktase (CAR)

Carbonsäure-Reduktasen (CAR) setzen unter Verbrauch von ATP, NADPH und der Nutzung von katalytischen Mengen Mg^{2+} Carbonsäuren zu den korrespondierenden Aldehyden um (Gross und Zenk 1969) (Kato, Joung, et al. 1991) (Li und Rosazza 1997). In diesem schrittweisen Prozess wird die Säure unter AMP-Bindung aktiviert, anschließend wird die Säure als Thioester im aktiven Zentrum des Enzyms gebunden und der Aldehyd nach Reduktion durch NADPH freigesetzt (vgl. Abbildung 3). (Li und Rosazza 1998) (Akhtar, Turner und Jones 2013) Die CAR kann ein breites Spektrum an Substraten zu Produkten umsetzen (Chen und Rosazza 1994) (Li und Rosazza 1997) (Rosazza und Li 1998).

Durch Vergleich der Sequenzen konnten für die CAR, isoliert aus *Nocardia* sp. von He *et al.*, hohe Homologien zu AMP-bindenden Proteinen (Aminosäure 90-544) sowie in der C-terminalen Domäne zu NADPH-bindenden Proteinen identifiziert werden (He, Li, et al. 2004).

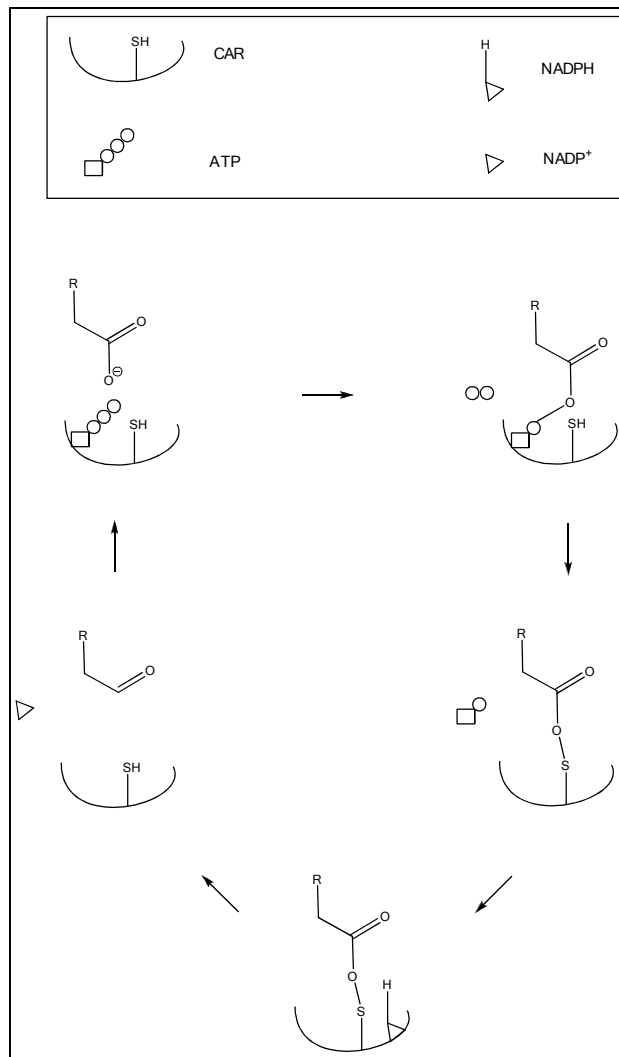


Abbildung 3: Reaktionsmechanismus der CAR, nach Akhtar et al. (2013)

1.8 Aufgabenstellung

Da bekannt ist, dass sowohl DOX als auch CAR lineare Fettsäuren zu den jeweiligen Aldehyden biotransformieren können, wurde der Fragestellung nachgegangen, ob sich mit diesen Enzymen aromaaktive verzweigt-kettige Aldehyde herstellen lassen.

Zielsetzung dieser Arbeit war die Produktion von natürlichem 12-Methyltridecanal, bei welcher die Fettsäuren des Lipidextrakts von *Conidiobolus heterosporus* (CHET-N) als Ausgangssubstanzen zur Umsetzung genutzt werden sollen. Die rekombinant aus *Escherichia coli* (*E. coli*) hergestellten Enzyme sollten auf ihr Potential untersucht werden, verschiedene Aromen aus Fettsäuren zu generieren. Ebenso waren die Enzyme in Bezug auf die Umsatzraten zu vergleichen.

2.1 Material & Methoden

2.2 Geräte

Alle verwendeten Geräte sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Agarosegel-dokumentationskammer	DeVision G	Decon Science Tec, Hohengandern
Agarosegel-dokumentationssoftware	DeVision G Ver. 2.0	Decon Science Tec
Autoklav (groß)	Laboklav 160 MSL	SHP Steriltechnik AG, Magdeburg
Autoklav (klein)	Tischautoklav 25B	SHP Steriltechnik AG
Brutschrank	INE 500	Memmert, Wertheim
Eismaschine	AF 80	Scotsman, Berlin
Elektrophoresenetzgerät	Power Supply EV231/EV262	Peqlab, Erlangen
Elektrophoresetrennsystem	Mini Protean® Tetra-Trennsystem	Biorad, Hercules, USA
Gefriertrocknungsanlage	Alpha 1-2 LDplus	Martin Christ, Osterode
Geleschüttler	Gyro-rocker SSL3	Stuart, Staffordshire, UK
Gel-Scanner (VIS)	Microtek Bio 5000 Type MRS-9600 TFU2B	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Heizblock	Accublock mini	Labnet, Edison, USA
Mikroliter Pipette	peQpette	peQLab, Erlangen
Nano-Photometer	Pearl-Nano	Implen, München
pH-Meter	Seven Easy	Mettler Toledo, Gießen
Reinstwasseranlage	Stedim biotech arium® 611 VF	Satorius, Göttingen
Sequenzierauswertungs-Software	Vector NTI, Vers. 11.5	Invitrogen, Carlsbad, USA
Spektral-Photometer	Specord 50	Analytic Jena, Jena
Sterilbank	HERA Safe KS 18	Thermo Scientific, Bonn

Tischzentrifuge	Allegra® x-15 R Rotor: SX4750A	Beckmann Coulter, Krefeld
Tischzentrifuge	Microfuge® 22 R	Beckmann Coukter
Trockenschrank (klein)	Heraues T6	Thermo Scientific
Trockenschrank (groß)	-	BINDER, Tuttlingen
Vortex	Mixer Uzusio VTX-3000	LMS, Brigachtal
Waagen		
Feinwaage	SI-234A	Denver Instrument, Denver, USA
Grobwaage	Atilon	Acculab Sartorius Group, Göttingen

Des Weiteren wurden die in Tabelle 2 aufgeführten Verbrauchsmaterialien eingesetzt.

Tabelle 2: Übersicht der verwendete Verbrauchsmaterialien

Gerät	Modell	Hersteller
Eppendorf Gefäße	safeSeal 2 mL	Sarstedt, Nümbrecht
Falcon-Tubes groß	Cellstar® Tubes 50 mL	Greiner bio one, Kranmünster, Austria
Falcon-Tubes klein	Cellstar® Tubes 15 mL	Greiner bio one
Glasvials	2 mL Schraubvials, Klarglas, mit Kurzgewinde	Wicom, Heppenheim
Membranfilter	Chromafil® PET-45/15 MS	Macherey Nagel
Micro Insert	Micro-Insert, 250 µL Inhalt	Wicom
Petrischalen	Petri Dish 94·15	Greiner bio one, Mosconmagyaravár, Ungarn
Pipettenspitzen groß	Pipette Tip Gibson® Style 1000 µL	Greiner bio one
Pipettenspitzen klein	Pipette Tip Gibson® Style 200 µL	Greiner bio one

Schraubkappe	Schraubkappe für Kurzgewinde blau mit Butylgummi, PTFE Septum	Wicom
Sterilnadel	Sterican [®] 1, 20 · 400 mm	B.Braun, Melsungen
Sterilspritze 1	Norm Ject [®] Tuberkulin 1 mL	Henke Sass Wolf, Tuttlingen
Sterilspritze 2	Injekt [®] 5 mL	B.Braun
Verschlussfolie	Parafilm [®]	Pechiney Plastic Packing

2.3 Chemikalien

Sämtliche verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Chemikalien

Substanz	Reinheit	Hersteller
Aceton		Carl Roth, Karlsruhe
Acrylamid-Bisacrylamid- Stammlösung, Rotiphoese Gel 40	40% in Wasser; 37,5:1	Carl Roth
Agar-Agar	für die Mikrobiologie	Carl Roth
Agarose	für die Gelelektrophorese	Biozym, Hessisch Oldendorf
Agarsoegelauftragepuffer, CoralLoad PCR Buffer 10 x;		Qiagen, Hilden
Aluminiumsulfat-Hydrat		Carl Roth
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	> 98% p.a.	Applichem, Darmstadt
Bortrifluorid-Lösung	20%ig in MeOH	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau, Natriumsalz	für die Gelelektrophorese	Carl Roth
(Z)-7-Decenal	> 99%	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Coomassie Brilliantblau G 250		Applichem, Darmstadt

Dichlormethan	> 99,5%	VWR, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)		AppliChem
Dimethylsulfoxid (DMSO)	> 99,5%	Carl Roth
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat	reinst.	Bernd Kraft, Duisburg
DNA Leiter und Gelladepuffer 100 bp und 1 kbp		Carl Roth
Dodecanal	95%	Alfa Aesar
Ethanol	99,5%	Carl Roth
Ethanol	> 99,8%, m. Methylethylketon (MEK) vergällt	Schmidt Chemikalien, Dillenburg
Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatrium (EDTA)	>99% p.a.	AppliChem
D-Glucose-Monohydrat	Für die Mikrobiologie	Carl Roth
Glycerol	> 99% (GC)	Sigma-Aldrich
Hefeextrakt	Pulver, für die Bakteriologie	Carl Roth
n-Heptan	HPLC-grade	Sigma-Aldrich
Hexadecanal	> 99%	TCI, Eschborn
Hexadecansäure	98%	Acros oragnics, Geel, Belgien
Isopropyl- β -D - thiogalactopyranosid (IPTG)	> 99% f. d. Mikrobiologie	Carl Roth
Kanamycin-Sulfat		Carl Roth
Malzextrakt		Sigma Aldrich
Natriumchlorid	> 99,8%	Carl Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Ph. Eur.	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat	99%	Fluka, Steinheim
Natriumhydroxid	\geq 99%	Carl Roth
Natriumsulfat	> 99%	Carl Roth
Pentadecanal	> 99%	Sigma-Aldrich

Pepton	> 99%	Sigma-Aldrich
p-Nitrophenylacetat	> 99%	Sigma-Aldrich
p-Nitrophenylbutyrat	> 99%	Sigma-Aldrich
p-Nitrophenyloctanoat	> 99%	Sigma-Aldrich
p-Nitrophenylpalmitat	> 99%	Sigma-Aldrich
p-Nitrophenylvalerat	> 99%	Sigma-Aldrich
Phosphorsäure 85%	85% reinst.	Carl Roth
Protein-Leiter, <i>unstained</i> <i>Protein ladder</i>		Thermo Scientific, Schwerte
Salzsäure 34%	Normapur	VWR
Supelco® 37 Component FAME Mix		Sigma-Aldrich
Stickstoff (g)	5.0	Praxair, Düsseldorf
Tetradecanal	99%	TCI
Tetradecansäure	99%	Acros oragnics
N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin (TEMED)	> 99%	AppliChem
Tris(hydroxymethyl)- aminomethan (Tris)	> 99,3%	Carl Roth
Tridecanal	90%	Sigma-Aldrich
Triton® X-100	Ph. Eur.	Carl Roth
Trypton	> 99,5% Ph. Eur.	Carl Roth
Wasserstoff (g)	5.0	Praxair, Biebesheim am Rhein
11-Methyltridecansäure	> 99,5%	CPS, Aachen

2.4 Fettsäuren und Aldehyde

Die von der Firma Symrise AG, Holzminden erhaltenen methylverzweigten Fettsäuren und Aldehyde sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Fettsäuren

Fettsäurebezeichnung	Kurzschreibweise
Tetradecansäure	C _{14:0}
Hexadecansäure	C _{16:0}
12-Methyltetradecansäure	a15:0
13-Methylpentadecansäure	a16:0
12-Methyltridecansäure	i14:0
13-Methyltetradecansäure	i15:0
14-Methylpentadecansäure	i16:0
Aldehyde	
Hexadecanal	
12-Methyltetradecanal	
13-Methylpentadecanal	
12-Methyltridecanal	
13-Methyltetradecanal	
14-Methylpentadecanal	

2.5 Mikroorganismen

Der mit BL21(DE3) bezeichnete *E. coli*-Stamm beinhaltet den Genotyp: F⁻ omp^T hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3) λ(DE3[lacI lacUV5-T7 gene 1 ind 1 sam 7 nin5]) und wurde von der Firma Novagen (St. Louis, USA) bezogen.

Der *E. coli*-Stamm BL21(DE3)pEt-PC2, in welchem sowohl die Carbonsäure-Reduktase (CAR) aus *Mycobacterium marinum* als auch die Phosphopantetheinyl-Transferase (PPT) aus *Bacillus subtilis* exprimiert wurden (CAR 1), wurde von Dr. Patrick R. Jones, *University of Turku*, Finnland mittels *Material Transfer Agreement* zur Verfügung gestellt.

Zwecks Vergleichs überließ die Firma Symrise AG, Holzminden, weitere *E. coli*-Stämme. MmFad9:NC_010612.1 exprimiert eine CAR aus *Mycobacterium marinum* (CAR 2), Nsp_CAR:AY495697.1 hingegen eine CAR aus *Nocardia* sp. (CAR 3).

Der Pilz CHET-N wurde von CBS- *KNAW Fungal Biodiversity Centre (Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences)* bezogen.

2.6 Plasmide

2.6.1 Plasmide DOX

Die codierenden Plasmide für die α -Dioxygenasen, pET-28a(+)- α -DOX und pET 28a(+)- α -DOX *Cyanothece* sp., wurden von Prof. Dr. Jens Schrader von der Arbeitsgruppe industrielle Biotechnologie des DECHEMA-Forschungsinstitutes (Frankfurt) zur Verfügung gestellt. Das Plasmid, welches zur Blindkontrolle genutzt wurde, wurde von der Firma Novagen bezogen. Die Eigenschaften und Benennung der Plasmide sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Liste der verwendeten Leer-, Kontroll- und DOX-Plasmide und ihrer Eigenschaften

Bezeichnung	Eigenschaft	Genkarte
pET28a(+)	Expressionsvektor, Kanamycinresistenz (<i>KanR</i>), <i>origin of replication</i> (<i>f1 ori</i>) und <i>lac operon</i> (<i>lacI</i>)	Abbildung 4
pET28a(+)- α -DOX	Expressionsvektor, Kanamycinresistenz (<i>KanR</i>), <i>origin of replication</i> (<i>f1 ori</i>) und <i>lac operon</i> (<i>lacI</i>) mit α -Dioxygenase-Insert	Abbildung 5
pET28a- α -DOX <i>Cyanothece</i> sp.	Expressionsvektor, Kanamycinresistenz (<i>KanR</i>), <i>origin of replication</i> (<i>f1 ori</i>) und <i>lac operon</i> (<i>lacI</i>) mit α -Dioxygenase-Insert	Abbildung 6
pUC19	Ampicillinresistenz (<i>AmpR</i>), <i>origin of replication</i> (<i>f1 ori</i>) und <i>lac operon</i> (<i>lacI</i>)	Abbildung 7

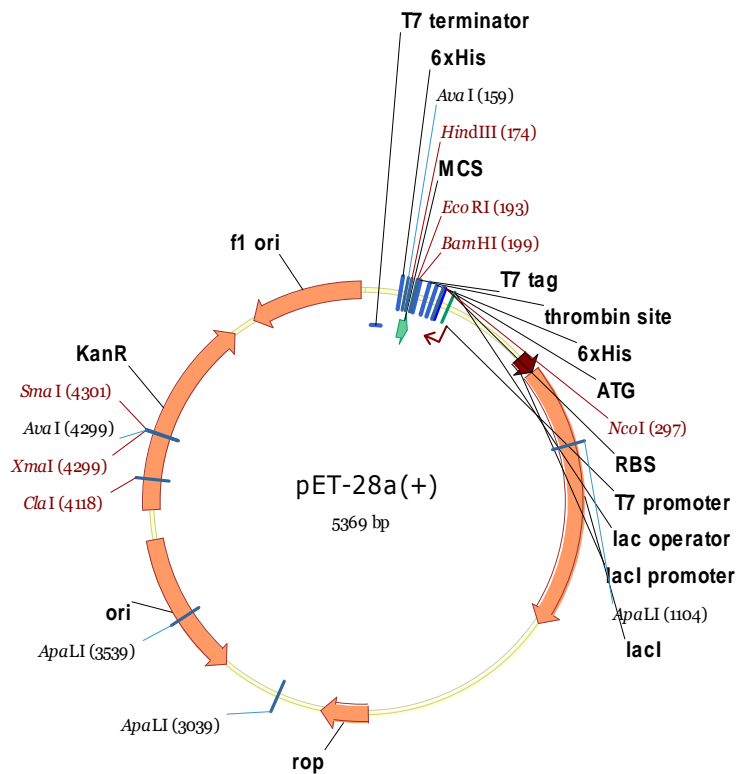


Abbildung 4: Schematische Plasmidkarte von pEt28a(+) (LLC)

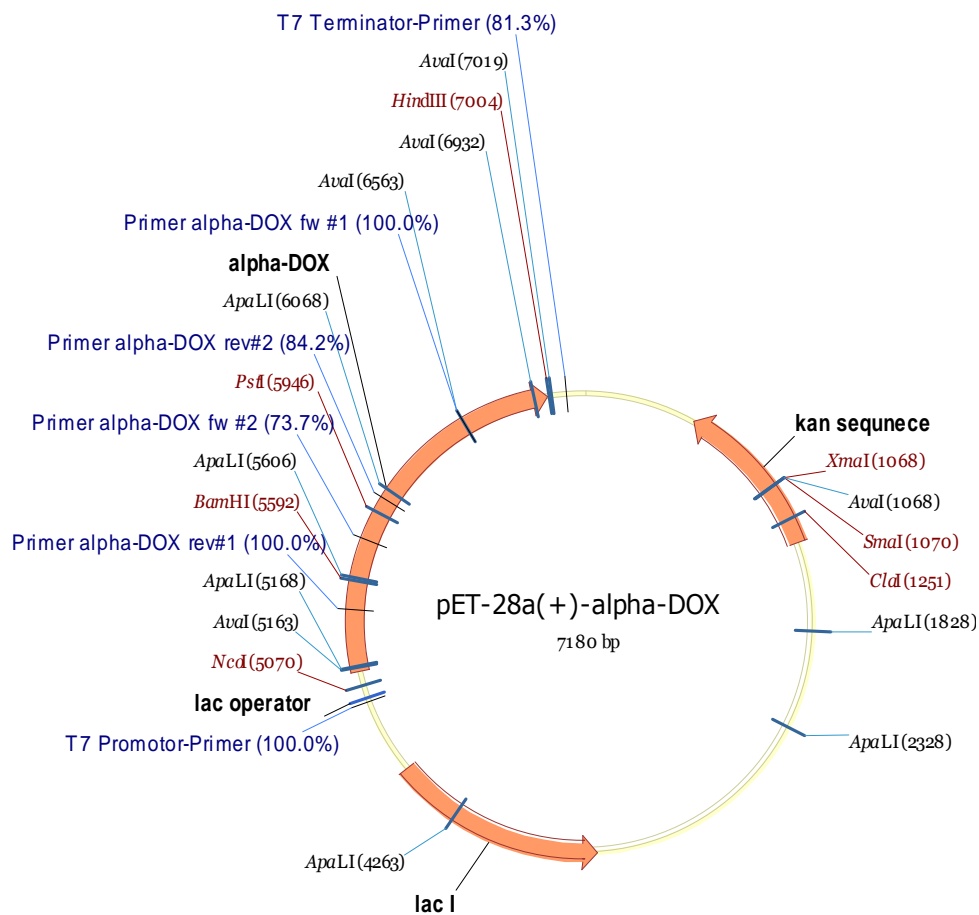


Abbildung 5: Schematische Plasmidkarte von pET28a(+)-alpha-DOX (Dechema)

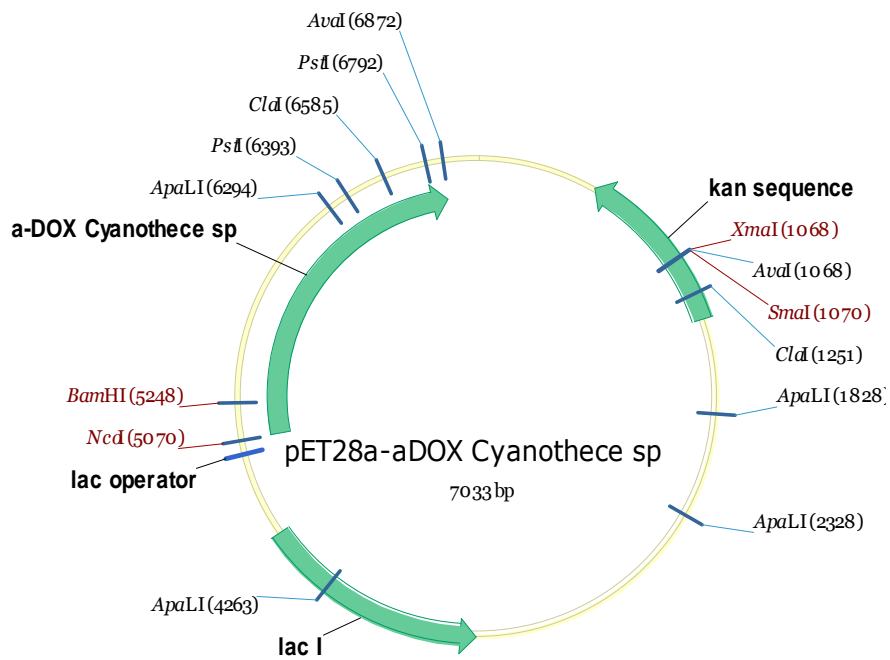


Abbildung 6: Schematische Plasmidkarte von pET28a-aDOX *Cyanotherce* sp. (Dechema)

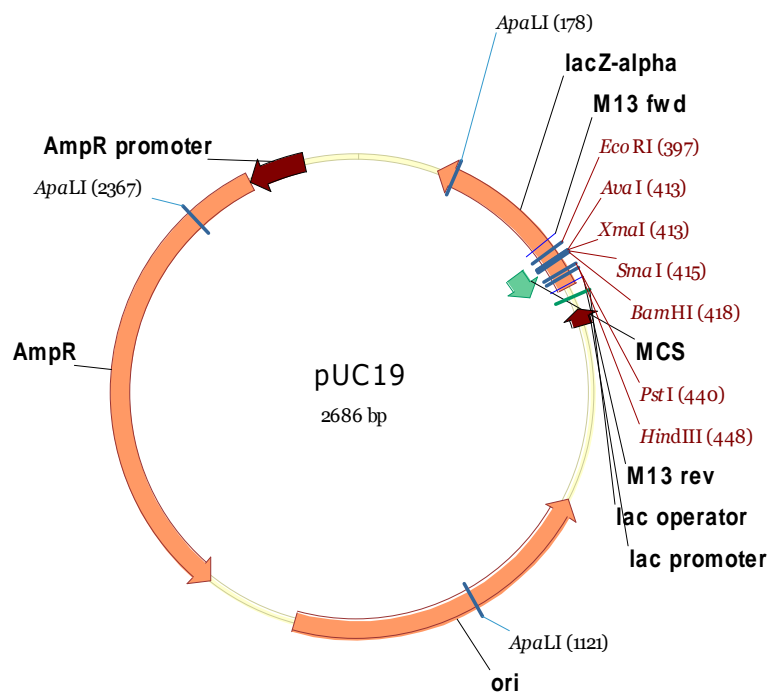


Abbildung 7: Schematische Plasmidkarte von pUC19 (LLC)

2.6.2 Plasmide CAR

Die Stämme, welche die kodierenden Plasmide für CAR aus *Mycobacterium marinum* (MmFad9:NC_010612.1) bzw. die CAR aus *Nocardia* sp. (Nsp_CAR:AY495697.1) beinhalten, sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Das Plasmid, welches zur Blindkontrolle genutzt wurde, wurde von der Firma Novagen bezogen. Die Eigenschaften und Benennung der Plasmide sind in Tabelle 6: Liste der verwendeten Leer-, Kontroll- und CAR-Plasmide und ihrer Eigenschaften, aufgeführt.

Tabelle 6: Liste der verwendeten Leer-, Kontroll- und CAR-Plasmide und ihrer Eigenschaften

Bezeichnung	Eigenschaft	Genkarte
pET28a(+)	Expressionsvektor, Kanamycinresistenz (<i>KanR</i>), <i>origin of replication</i> (<i>f1 ori</i>) und <i>lac operon</i> (<i>lacI</i>)	Abbildung 4
MmFad9:NC_010612.1	Expressionsvektor, Kanamycinresistenz (<i>KanR</i>), <i>origin of replication</i> und <i>lac operon</i> (<i>lacI</i>) mit Carbonsäure-Reduktase-Insert	Abbildung 8
Nsp_CAR:AY495697.1	Expressionsvektor, Kanamycinresistenz (<i>KanR</i>), <i>origin of replication</i> und <i>lac operon</i> (<i>lacI</i>) mit Carbonsäure-Reduktase-Insert	Abbildung 9

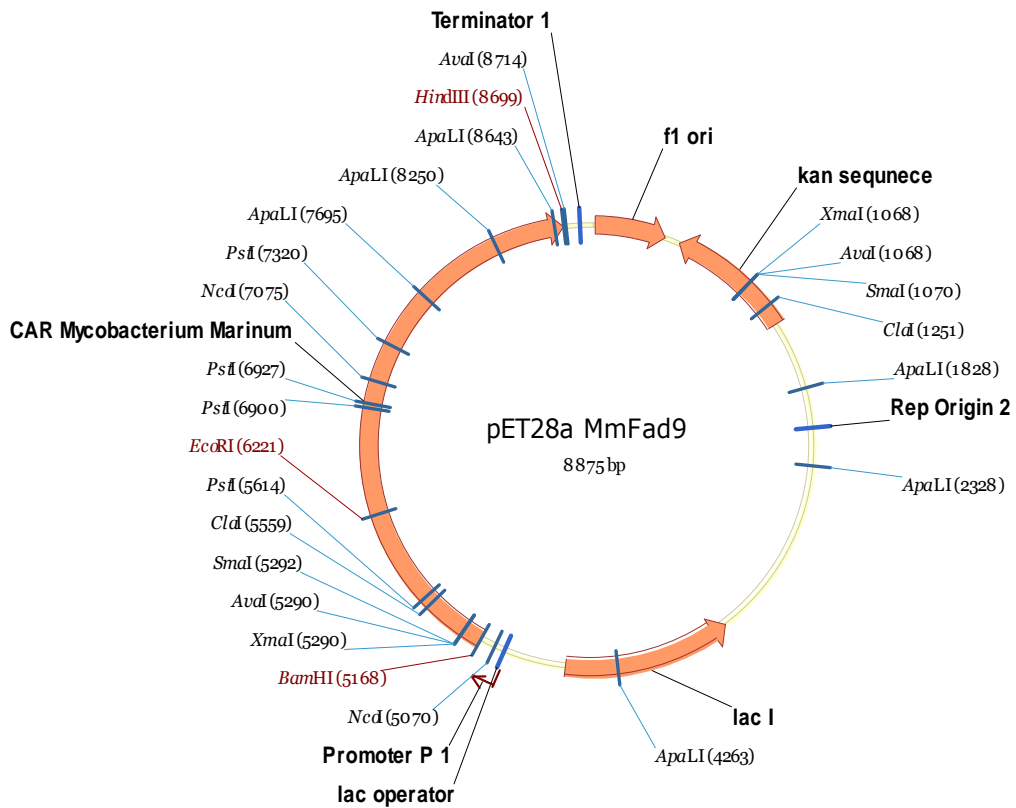


Abbildung 8: Schematische Plasmidkarte von MmFad9:NC_010612.1

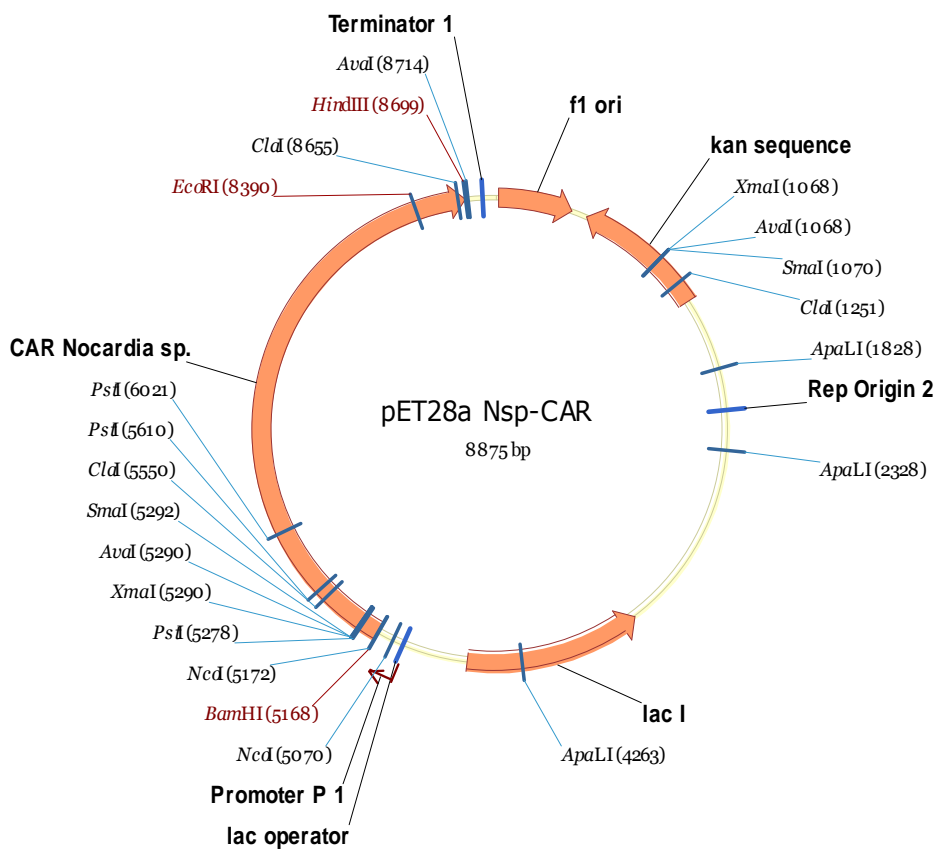


Abbildung 9: Schematische Plasmidkarte von Nsp_CAR:AY495697.1

2.7 Kulturführung *E. coli*

Die mikrobiologischen Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen unter einer Steril-Werkbank. Die verwendeten Materialien (Gefäße, Medien und Pipetten) wurden vor der Benutzung autoklaviert (121 °C, 30 min).

2.7.1 Vorkulturführung *E. coli*

Für die in Flüssigkultur geführten Vorkulturen wurde LB (Luria Bertani)-Medium verwendet, welchem nach dem Autoklavieren die jeweiligen Antibiotika zugesetzt wurden (Tabelle 7: Zusammensetzung des LB -Mediums). Unter sterilen Bedingungen wurden 100 µL des 15%igen Glycerolstocks der Bakterien in ein mit 3 mL LB-Medium befülltes 15-mL-Zentrifugenröhrchen überführt. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37 °C auf dem Inkubationsschüttler (Ecotron, Infors; 250 U min⁻¹, Auslenkung 25 mm) inkubiert, bis alle Kulturen die gleiche Zelldichte aufwiesen (OD₆₀₀ = 0,6 - 0,7; 1:20).

Tabelle 7: Zusammensetzung des LB -Mediums

Medienbestandteil	Konzentration [g L ⁻¹]
Trypton	10,0
Hefeextrakt	5,0
Natriumchlorid	5,0
Ampicillin	0,0167
(CAR, Zugabe nach dem Autoklavieren)	
Kanamycin	0,03
(MmFad9:NC_010612.1 und Nsp_CAR:AY495697.1, Zugabe nach dem Autoklavieren)	
Kanamycin	0,025
(pET28a(+)-α-DOX pET28a und α-DOX <i>Cyanothece</i> sp. Zugabe nach dem Autoklavieren)	

Bei der Kulturführung auf Agar-Platten wurde vor dem Autoklavieren des Mediums 1,5 % Agar (w/v) zugemischt. Bei der Herstellung von Selektivplatten wurde das Antibiotikum analog zu den Flüssigmedien nach dem Autoklavieren zugegeben.

2.7.2 Stammhaltung von *E. coli*

Ein 1 mL Glycerol Stock (15 %ig) in einem 2 mL Eppendorf Tube wurde sowohl von den nicht transformierten als auch von den transformierten Zellen angefertigt und bei -80 °C gelagert.

2.8 Expressionskulturen der *E. coli*-Stämme

2.8.1 *E. coli* Stämme mit DOX codierenden Plasmiden

Die Proteinexpression der Stämme, welche für die DOX codieren, ist in folgendem Schema (Abbildung 10) dargestellt. Die Zellen wurden aus den jeweiligen Glycerol-Stocks (2.7.2) entnommen. Mittels Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) wurden die Zellen induziert.

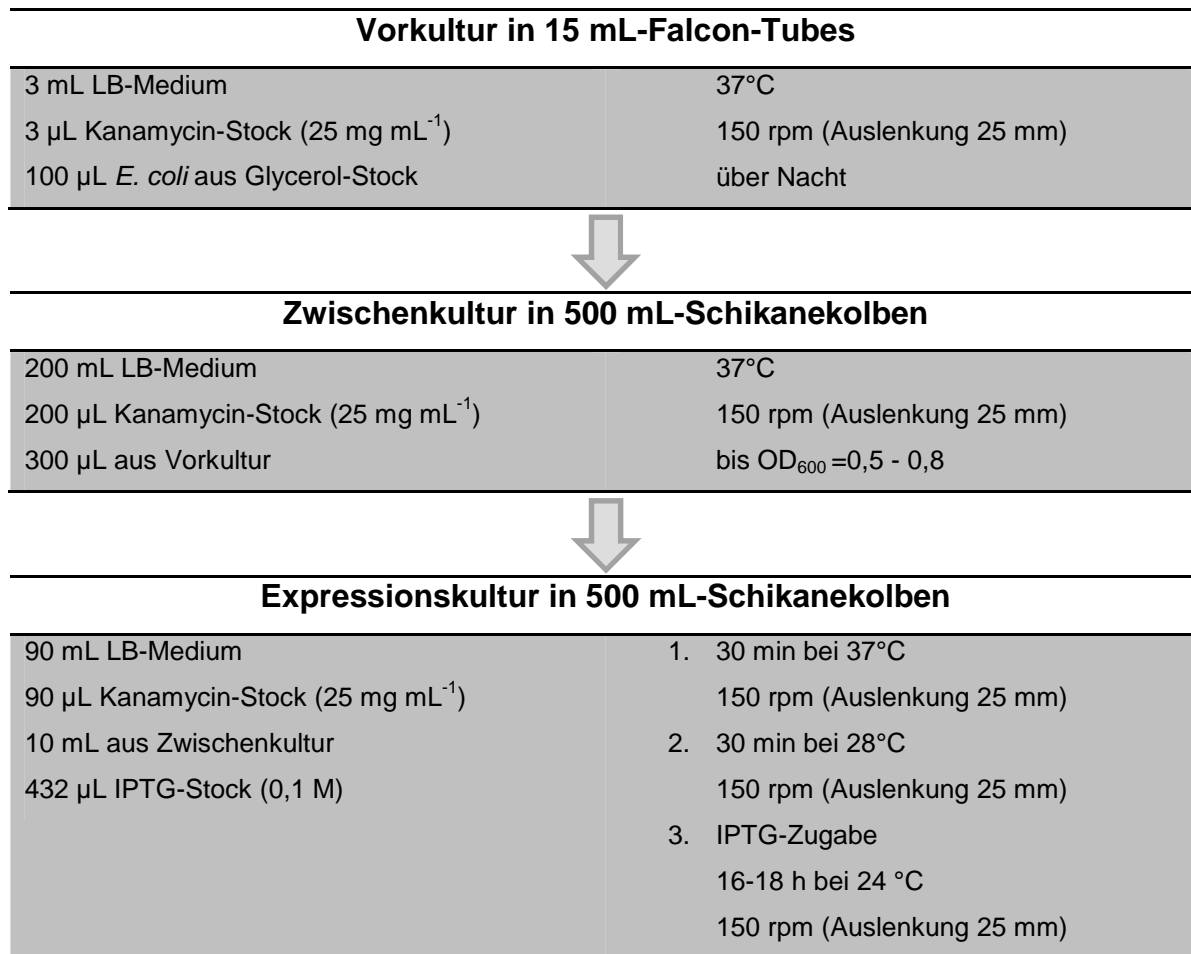


Abbildung 10: Schema der Expression von Enzymen durch *E. coli*- Zellen

2.8.2 *E. coli* Stämme mit CAR codierenden Plasmide

Für die Expression wurden 200 mL *Overnight Express Instant* TB-Medium (Novagen, Merck KGaA, Darmstadt; Tabelle 8) in 500-mL-Schikanekolben verwendet. Darin wurde der jeweilige *E. coli*-Stamm für 20 h bei 30 °C inkubiert (Ecotron, Infors; 250 U min⁻¹, Auslenkung 25 mm). Sobald die gleiche OD₆₀₀ der einzelnen Kulturen erreicht war, wurden die Zellen pelletiert (4 °C/ 4.500 rpm/ 4713g) und bei -20 °C im Gefrierschrank aufbewahrt.

Tabelle 8: Overnight Express Instant TB-Medium (Novagen)

Medienbestandteil	Konzentration [L ⁻¹]
<i>Overnight Express Instant</i> TB-Medium (Novagen)	60,0 g
Glycerol	10,0 mL
Ampicillin (CAR, Zugabe nach dem Autoklavieren)	16,7 mg
Kanamycin (MmFad9:NC_010612.1 und Nsp_CAR:AY495697.1, Zugabe nach dem Autoklavieren)	30,0 mg

2.8.3 Isolierung der CAR

Die Isolierung der Enzyme wurde gemäß der Anleitung des Kits Protino[®] Ni-TED (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren) mit folgender Optimierung durchgeführt: Nach Akhtar *et al.* (2013) wurden anstelle von 1 mg mL⁻¹ 2 mg mL⁻¹ Lysozym verwendet.

Das gesammelte Eluat wurde mit 3% (v/v) β -Mercaptoethanol versetzt und je 10 mL wurden über Nacht in 2 L Tris-HCl-Puffer (50 mM, pH 7,5) bei 4 °C dialysiert (20 cm Cellu Sep[®] T2 Dialyseschlauch, 10 mm Breite, 6 - 8 kDa; Scienova, Jena). Das Dialysat wurde zentrifugiert (Microfuge 22R, Beckman Coulter, Krefeld; 14.000 U min⁻¹, 18.000 x g, 4 °C), um ausgefallenes Protein durch Dekantieren zu entfernen.

2.8.4 Optimierung der Isolierung der CAR zwecks Bilanzierung der Ansätze

Zur Bilanzierung der Ansätze wurde der Tris-HCl-Puffer (vgl. 2.8.3) bei der Isolierung der CAR durch einen Phosphatpuffer (50 mM, pH= 7,5) ersetzt. Des Weiteren wurde anstatt einer Dialyse die Macrosept 30 K-Filtration verwendet. Hierzu wurde ein Aliquot von 10 mL mit 10 mL Phosphatpuffer (50 mM, pH = 7,5) solange zentrifugiert (4°C/ 4.500 rpm/ 4713 g), bis 10 mL des Retentats erreicht waren. Dieser Schritt wurde 7 Mal wiederholt.

2.8.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mittels Roti[®]-Nanoquant-Kit (K880; Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) nach Herstelleranweisung bestimmt.

Die nach 2.8.4 isolierten Enzymlösungen wurden für die jeweiligen Versuche verdünnt, sodass jeweils eine Konzentration von 100 µg mL⁻¹ und eine Konzentration von 500 µg mL⁻¹ zur Verfügung stand.

2.9 Transformation

2.10 Transformation von pET28a(+) mit und ohne DOX in *E. coli*- Zellen

Aus dem *E. coli* Glycerol-Stock von BL21(DE3) (2.7.2) wurden 100 µL bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert, ein Aliquot von 1,5 mL der Zellen pelletiert (30 s/ 11.000 g/ 4°C) und anschließend mit dreimal 1 mL dd H₂O gewaschen. Das jeweilige Plasmid wurde auf eine Konzentration von 0,5 µg µL⁻¹ verdünnt. Eingesetzt wurde für die Transformation 1 µL in dem Eppendorf Eporator (1.250 V/ mm). Anschließend wurden Klone mittels einer Impföse auf eine Masterplatte übertragen und bei 37°C inkubiert.

Die mit dem Plasmid pET28a(+) transformierten *E. coli*-Zellen wurden für Blindwerte der Biotransformationen mit den DOX und den CAR benötigt. Die Zellen mit pET28a(+)-α-DOX und pET28a-α-DOX *Cyanothece* sp. wurden für die Biotransformation der Fettsäuren verwendet.

2.10.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die diskontinuierliche SDS-PAGE diente der Bestimmung der Masse der nach 2.8 exprimierten und isolierten Proteine. Hierzu kamen folgende Lösungen und Puffer, modifiziert nach Laemmli (1970) zum Einsatz.

Tabelle 9: Zusammensetzung der Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (APS-Lösung)

Substanz	Konzentration [g L ⁻¹]
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	400,0
Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert	

Tabelle 10: Zusammensetzung Lower-Tris

Substanz	Konzentration [g L ⁻¹]
Tris-HCl	181,7
SDS	4,0
pH-Wert (eingestellt mit 1 M HCl)	pH 8,8

Tabelle 11: Zusammensetzung Upper-Tris

Substanz	Konzentration [g L ⁻¹]
Tris-HCl	60,6
SDS	4,0
pH-Wert (eingestellt mit 1 M HCl)	pH 6,8

Tabelle 12: Zusammensetzung des Proben-Auftragspuffers (PAP)

Substanz	Eingesetzte Menge
1 M Tris-HCl, pH 6,8	1,0 mL
SDS-Lösung (20%ig)	2,0 mL
Bromphenolblau	20,0 mg
Glycerol	2,3 mL
Reinstwasser ad 8,0 mL	
der Puffer wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.	

Tabelle 13: Zusammensetzung des Laufpuffers (10x)

Substanz	Konzentration [g L ⁻¹]
TRIS-HCl	30,2
L-Glycin	144,2
SDS	10,0
pH-Wert (eingestellt mit 1 M HCl)	pH 8,8

Vor der Verwendung wurde der Laufpuffer (Tabelle 13) 1:10 (v/v) mit VE-Wasser verdünnt (1x Laufpuffer).

Tabelle 14: Zusammensetzung kolloidales Coomassie

Substanz	Eingesetzte Menge [L ⁻¹]
Coomassie Brilliantblau G 250	1,0 g
Ethanol	100 mL
Aluminiumsulfat-Hydrat	50,0 g
Phosphorsäure (85%ig)	23,5 mL

Die Färbelösung (Tabelle 14) wurde über Nacht gerührt und anschließend filtriert.

Für ein 12%iges Trenngel mit einem 6%igen Sammelgel wurden folgende Lösungen verwendet (Tabelle 15):

Tabelle 15: Pipettierschema für 12%ige Trenn- und 6%ige Sammelgele

Substanz	Trenngel (12%ig)	Sammelgel (6%ig)
Reinstwasser	2700,0 µL	1800,0 µL
Lower-Tris	1500,0 µL	-
Upper-Tris	-	750,0 µL
Rotiphorese Gel 40	1800,0 µL	450,0 µL
APS-Lösung	15,0 µL	10,0 µL
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	7,5 µL	4,0 µL

2.10.2 Probenvorbereitung

Für isoliertes Enzym wurden 20 µL der Proteinlösung mit 3 µL 1 M Dithiothreitol (DTT) und 6 µL des PAP versetzt und anschließend für 15 min auf 95 °C erhitzt.

Von unbehandelten Zellen wurde 1 mg des jeweiligen Pellets in 25 µL Tris EDTA-Puffer aufgenommen (Tabelle 16) und anschließend mit 50 µL PA-Puffer und 17 µL Dithiotreithiol für 15 min auf 95 °C erhitzt.

Tabelle 16: Zusammensetzung Tris-EDTA(TE)-Puffer

Substanz	Eingesetzte Menge [L ⁻¹]
Tris-HCl	1,58 g
EDTA	0,29 g

2.10.3 Probenlauf

Die angefertigten Gele wurden in die Trennkammer eingesetzt, diese mit 1x Laufpuffer gefüllt und je 25 µL der Proben (2.10.2) in die Taschen pipettiert. Als Größenstandard dienten 8 µL des *Page Ruler Unstained Protein Ladder* (10 – 200 kDa; Thermo Fisher Scientific, Braunschweig).

Solange sich die Proben im Sammelgel befanden, wurde für den Lauf eine konstante Stromstärke von 10 mA pro Gel gewählt. Sobald die Proben das Trenngel erreichten, wurde die Stromstärke auf 20 mA pro Gel erhöht.

2.10.4 Coomassiefärbung

Die Färbung der Gele erfolgte mit modifiziertem kolloidalen Coomassie-Blau nach Neuhoff *et al.* (1988). Die Gele wurden mit der Coomassie-Lösung (Tabelle 14) überschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur angefärbt.

2.11 Enzymatische Umsetzungen

2.11.1 Enzymatische Oxidation mittels DOX

Die Biotransformation der Fettsäuren mittels der DOX aus *Oryza sativa* und *Cyanothece* sp. erfolgte in Anlehnung an die Vorschrift von Kaehne *et al.* (Kaehne, Buchhaupt und Schrader 2011). Allerdings wurden die Zellen lyophilisiert.

35,7 mg der nach 2.8.1 hergestellten Zellpellets wurden in einem 15 mL Zentrifugenröhrchen mit 12 mL Waschpuffer (Tabelle 17) dispergiert und danach zentrifugiert (4.000 rpm, 3.274 g, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde in 6 mL des Umsetzungspuffers mit 1%igem Triton[®]X-100 - Zusatz (Tabelle 18) resuspendiert. Anschließend wurden 600 µL der Substratlösung (10 mM in DMSO, Tabelle 4) zugegeben und bei 37 °C und 240 rpm (Auslenkung 25 mm) für 3 h inkubiert. Jede Stunde wurden 2 mL Probe entnommen und mit 2 mL *n*-Heptan extrahiert. Die Probe wurde zentrifugiert (4.000 rpm, 3.724 g, 10 min, 4 °C) um eine Phasentrennung zu erreichen. Nach Trocknung der organischen Phase mit Natriumsulfat und Membranfiltration (Porenweite 45 µm) wurde die Probe gaschromatisch analysiert (vgl. Tabelle 29).

Tabelle 17: Zusammensetzung der Waschpuffer

Waschpuffer	
Na ₂ HPO ₄	26,7003 g
NaH ₂ PO ₄	7,8002 g
Reinstwasser	ad 1.000 mL

Tabelle 18: Zusammensetzung der Umsetzungspuffer

Umsetzungspuffer	
Na ₂ HPO ₄	26,7002 g
NaH ₂ PO ₄	7,8001 g
Glucose-Monohydrat	5,454 g
Reinstwasser	ad 1.000 mL

2.11.1.1 Olfaktorische Messung

Um die Geruchseindrücke der Produkte zu analysieren, wurden die Biotransformationsproben sowie die Referenzstandards durch zwei Personen mittels Gaschromatographie-Olfaktometrie erfasst (siehe Tabelle 30).

2.11.1.2 Blindwert der enzymatischen Umsetzung

75 mg der Zellpellets von pET28a- α -DOX *Cyanothece* sp. wurden in 1 mL Umsetzungspuffer (vgl. Tabelle 18) abgekocht (100 °C für 15 min). In der Folge wurden die Fettsäuren (100 mM in DMSO, Tabelle 4) dazu pipettiert und für 1 h (37 °C, 150 rpm, Auslenkung 25 mm) inkubiert. Die Probe wurde mit 1 mL *n*-Heptan extrahiert und anschließend zentrifugiert (4.000 rpm, 3.724 g, 10 min, 4 °C) um eine Phasentrennung zu erreichen. Nach Trocknung der organischen Phase mit Natriumsulfat und Membranfiltration (Porenweite 45 μ m) wurde die Probe gaschromatographisch analysiert (siehe Tabelle 29).

2.11.2 Enzymatische Reduktion mittels Carbonsäure-Reduktase

2.11.2.1 Ganzzellkatalyse der CAR-exprimierenden *E. coli*-Stämme

In einem 10-mL-Reaktionsgefäß wurden 1 mL der Reaktionsmischung (Tabelle 19) für 24 h bei 30 °C und 250 rpm inkubiert.

Tabelle 19 Zusammensetzung der GZK

Substanz	Eingesetzte Menge
Jeweiliges <i>E. coli</i> - Pellet	25 mg/ 125 mg
Sørensen-Puffer pH = 7,5 100 mM D-(+)-Glucose: 100mM	1 mL
Substrat (12-Methyltridecansäure (12-MTS); gelöst in Hexan)	0,5 mM

Nach 24 h wurden die jeweiligen Ansätze mit 100 μ L 18%iger HCl auf einen pH = 2 eingestellt. Die Probe wurde mit 1 mL DCM extrahiert, zentrifugiert (4.000 rpm,

3.724 g, 10 min, 4 °C), um eine Phasentrennung zu erreichen, und anschließend 1 µL der organischen Phase gaschromatographisch analysiert (2.11.10 und Tabelle 31).

2.11.2.2 Kinetik der Ganzzellkatalyse

Analog 2.11.2.1 wurden die Proben angesetzt, jedoch erfolgte die Aufarbeitung der Proben nach 1, 2, 4 und 6 h.

2.11.2.3 Blindwerte der Ganzzellkatalyse

25 mg des Zellpellets der CAR exprimierenden Stämme (vgl. 2.8.2) wurden in 1 mL Sørensenpuffer (vgl. Tabelle 19) abgekocht (95 °C für 15 min). In der Folge wurde 12-Methyltridecansäure (12-MTS) (Konzentration im Ansatz: 0,5 mM; 100 mg in 1 mL *n*-Hexan) dazu pipettiert und für 24 h (30 °C, 250 rpm, Auslenkung 25 mm) inkubiert.

Die Ansätze wurden nach 24 h mit 100 µL 18%iger HCl auf einen pH = 2 eingestellt und anschließend zentrifugiert (4.000 rpm, 3.724 g, 10 min, 4 °C), um eine Phasentrennung zu erreichen. Die Mischung wurde mit 1 mL DCM extrahiert und danach 1 µL der organischen Phase gaschromatographisch analysiert (2.11.10 und Tabelle 31).

2.11.2.4 Blindwerte der Ganzzellkatalyse des *E. coli*-Stammes mit pET-28a

25 mg des Zellpellets der CAR exprimierenden Stämme (vgl. 2.8.2) wurden in 1 mL Sørensenpuffer (vgl.) abgekocht (95 °C für 15 min). In der Folge wurde sowohl 12-MTS (Konzentration im Ansatz: 0,5 mM, 100 mg in 1 mL *n*-Hexan; Blindwert 1), als auch in einem separatem Ansatz 12-Methyltridecanal (Konzentration im Ansatz: 0,25 mM, 25 mg in 1,5 mL Aceton; Blindwert 2) dazu pipettiert und für 24 h (37 °C, 250 rpm, Auslenkung 25 mm) inkubiert.

Die Ansätze wurden nach 24 h mit 100 µL 18%iger HCl auf einen pH = 2 eingestellt und anschließend zentrifugiert (4.000 rpm, 3.724 g, 10 min, 4 °C), um eine Phasentrennung zu erreichen. Die Mischung wurde mit 1 mL DCM extrahiert und

danach 1 μL der organischen Phase gaschromatographisch analysiert (2.11.10 und Tabelle 31).

2.11.2.5 Enzymatische Umsetzung mittels isolierter CAR

2.11.2.6 Funktionstest

In einem 10-mL-Reaktionsgefäß wurden 1.011 μL der Reaktionsmischung (Tabelle 20) für 30 h bei 30 °C im Ecotron Inkubationsschüttler (Infors; 250 U min^{-1} , Auslenkung 25 mm) inkubiert.

Tabelle 20: Zusammensetzung der enzymatischen Umsetzung mit Tris-HCl und mehreren Säuren

Substanz	Eingesetzte Menge
Jeweilige CAR-Proteinlösung (isoliert nach 2.8.3; 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	900 μL
ATP-Dinatriumsalz	1 mM
NADPH-Tetranatriumsalz	1 mM
$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	10 mM
Substrat (Undecansäure, 12-MTS; jeweils gelöst in <i>n</i> -Hexan)	0,5 mM

Die Ansätze wurde nach 24 h mit 100 μL 18%iger HCl auf einen pH = 2 eingestellt. Die Mischung wurde mit 1 mL Chloroform extrahiert und anschließend 1 μL der organischen Phase gaschromatographisch analysiert (Tabelle 32a).

2.11.3 Quantifizierung der Umsetzung

Zur Quantifizierung der verschiedenen nicht käuflichen Substanzen waren reine Standards nötig, um die Responsefaktoren (R_f) bestimmen zu können.

2.11.4 Synthese der Standards

2.11.4.1 Synthese von 12-Methyltridecanol (12-MTol)

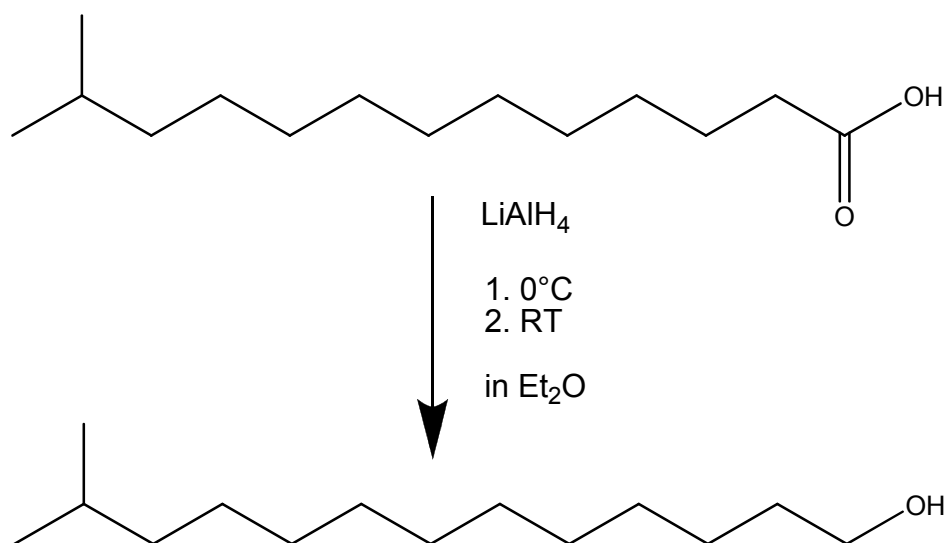


Abbildung 11: Synthese von 12-Methyltridecanol

In 20 mL Et_2O wurden 1024,7 mg LiAlH_4 (3 eq, 27,0 mmol) vorgelegt. Dazu wurden 2,00 g 12-MTS (1 eq, 9,0 mmol) gelöst in 10 mL Et_2O langsam zu getropft. Das Gemisch wurde über Nacht gerührt. Die Flüssig-Extraktion des Reaktionsansatzes erfolgte nach Quenchen mit Eiswasser unter Kühlung mit dreimal 50 mL Et_2O . Nach dem Trocknen über Natriumsulfat und Abdestillieren des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (MTBE: *n*-Hexan 1:3) gereinigt.

2.11.4.2 Synthese von 12-Methyltridecanal (12-MTol)

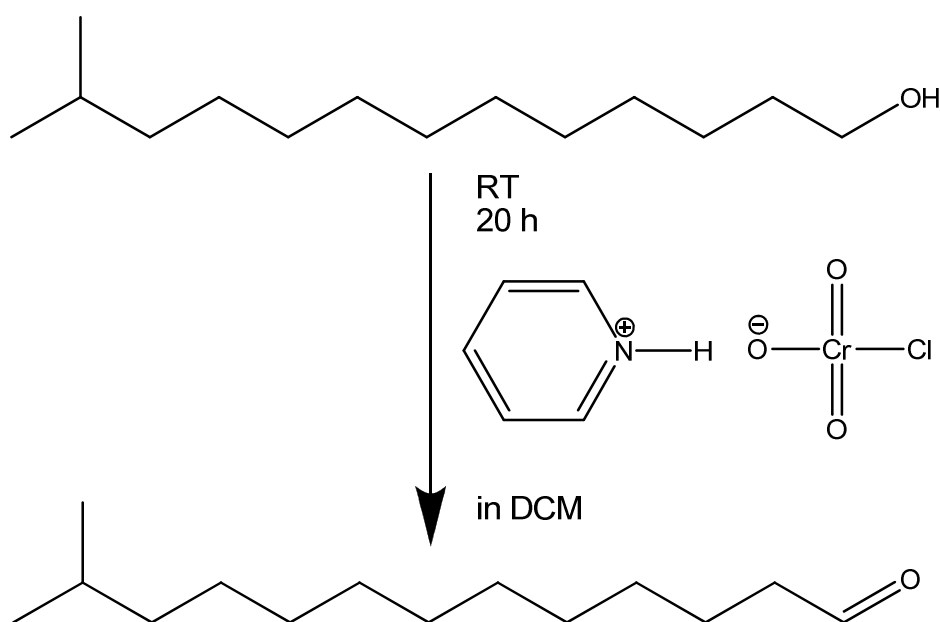


Abbildung 12: Synthese von 12-Methyltridecanal

In einem 100 mL Dreihalskolben wurden 904,9 mg (1,5 eq, 4,2 mmol) Pyridiniumchlorochromat (PCC) gelöst in 25 mL DCM vorgelegt. Unter Rühren tropften 600,0 mg (1,0 eq, 2,8 mmol) 12-MTol gelöst in 2,5 mL DCM langsam zu. Das Reaktionsgemisch wurde für 20 h gerührt. Zur Aufarbeitung wurde die Mischung mit 50 mL Et₂O versetzt und durch Kieselgel abfiltriert (Durchmesser = 10 cm, Höhe = 3 cm). Es wurde mit 150 mL Et₂O nachgespült. Nach Trocknen über Natriumsulfat und Abdestillieren des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (MTBE: *n*-Hexan 2:1) gereinigt.

2.11.4.3 Bestimmung der Responsefaktoren

Als interne Standards wurde 11-Methyltridecansäure (11-MTS) für das Edukt 12-MTS und (Z)-7-Decenal für die Produkte 12-MTol und 12-MTal gewählt. Für die Bestimmung der Responsefaktoren (Rf) wurden verschiedene Mischstandards angesetzt:

Tabelle 21: Standards für die Bestimmung des RF von 12-MTS zu 11-MTS

	Einwaage 11-MTS [mg mL ⁻¹]	Einwaage 12-MTS [mg mL ⁻¹]
Rf 1.1	0,1140	0,0114
Rf 1.2	0,1140	0,0285
Rf 1.3	0,1140	0,0570
Rf 1.4	0,1140	0,0855
Rf 1.5	0,1140	0,1140

Tabelle 22: Standards für die Bestimmung des RF von 12-MTol und 12-MTal zu (Z)-7-Decenal

	Einwaage (Z)-7-Decenal [mg mL ⁻¹]	Einwaage 12-MTol [mg mL ⁻¹]	Einwaage 12-MTal [mg mL ⁻¹]
Rf 2.1	0,2152	0,0508	0,0620
Rf 2.2	0,2152	0,1016	0,1239
Rf 2.3	0,2152	0,1524	0,1859
Rf 2.4	0,2152	0,2032	0,2478

Die Responsefaktoren wurden nach folgender Gleichung bestimmt:

$$Rf = \frac{c_i \cdot A_{IST}}{c_{IST} \cdot A_i}$$

mit c_i Konzentration der zu bestimmenden Substanz [mg mL⁻¹]

c_{IST} Konzentration des internen Standards [mg mL⁻¹]

A_i Fläche des Substanzpeaks im Kalibrierchromatogramm [Skt]

A_{IST} Fläche des internen Standards [Skt]

Die Konzentration der Umsetzungsprodukte wurde durch Gleichung berechnet:

$$c = \frac{A_i \cdot c_{IS} \cdot Rf}{A_{IS} \cdot M_i}$$

mit c Konzentration der identifizierten Substanz

[mmol mL⁻¹]

c_{IS} Konzentration des internen Standards [mg mL⁻¹]

A_i Fläche des identifizierten Substanz [Skt]

A_{IS} Fläche des internen Standards [Skt]

Rf Responsefaktor

M_i	Molare Masse von:	11-Methyltridecansäure	228,37 g mol ⁻¹
		12-Methyltridecansäure	228,37 g mol ⁻¹
		(Z)-7-Decenal	154,25 g mol ⁻¹
		12-Methyltridecanol	214,39 g mol ⁻¹
		12-Methyltridecanal	212,37 g mol ⁻¹

2.11.5 Bilanzierung der enzymatischen Umsetzung mittels CAR

In einem 10-mL-Reaktionsgefäß wurden 1.011 µL der Reaktionsmischung (Tabelle 20) für 24 h bei 30 °C im Ecotron Inkubationsschüttler (Infors; 250 U min⁻¹, Auslenkung 25 mm) inkubiert.

Tabelle 23: Zusammensetzung der enzymatischen Umsetzung

Substanz	Eingesetzte Menge
jeweilige CAR-Proteinlösung (100 µg mL ⁻¹ und 500 µg mL ⁻¹ in Phosphatpuffer (50 mM, pH = 7,5))	900 µL
ATP-Dinatriumsalz	1 mM
NADPH-Tetranatriumsalz	1 mM
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	10 mM
Substrat (12-MTS; gelöst in <i>n</i> -Hexan)	0,5 mM

Die Ansätze wurde nach 24 h mit 10 µL 18%iger HCl auf einen pH = 2 eingestellt. Die Mischung wurde mit 750 µL DCM und 250 µL der internen Standards (IST, gelöst in DCM) extrahiert und anschließend 1 µL der organischen Phase gaschromatographisch analysiert (2.11.10 und Tabelle 31).

2.11.5.1 Blindwerte der enzymatischen Umsetzung mittels CAR

Zusätzlich zu den enzymatischen Umsetzungen (2.11.2.5) wurden Blindwerte vermessen. Zum einem wurde die Enzymlösung durch Erhitzen auf 100 °C im Wasserbad für 30 min inaktiviert (Blindwert 1). Zum anderen wurde auf den Zusatz der Proteinlösung verzichtet und stattdessen die entsprechende Menge an Puffer verwendet (Blindwert 2).

Analog zu 2.11.2.5, mit Ausnahme, dass der Tris-HCl-Puffer durch Phosphatpuffer und das Extraktionslösungsmittel durch DCM ersetzt wurde, wurden Proben mit 12-MTS als Substrat und 100 µg mL⁻¹ als auch 500 µg mL⁻¹ der jeweiligen CAR-Lösung angesetzt. Die Proben wurden für 24 h inkubiert und nach 2.11.5 aufgearbeitet.

2.11.6 Kinetik der enzymatischen Umsetzung von 12-MTS mittels CAR

Analog zu 2.11.5 wurden Proben mit 12-MTS als Substrat und $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ und $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ der jeweiligen CAR-Lösung angesetzt. Die Proben wurden für 2, 4 und 6 h inkubiert und nach 2.11.5 aufgearbeitet.

2.11.7 Bestimmung der Aktivität mittels NADPH-Assay

Um die Aktivität der Enzyme auf die Umsetzung von 12-MTS vergleichen zu können, wurde die Abnahme der NADPH-Konzentration mittels Photometer bei einer Wellenlänge von 340 nm bestimmt. Der Assay wurde in Anlehnung an Akhtar *et al.* (Akhtar, Turner und Jones 2013) durchgeführt, mit der Abweichung, dass die gewählte Startkonzentration des Co-Substrates NADPH 0,2 mM betrug.

Die Konzentration der jeweiligen Enzyme betrug $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, die Zusammensetzung war wie folgt:

Tabelle 24: Bestimmung der CAR-Aktivität mittels der NADPH-Konzentration

	Null-Wert	Referenz	Probe
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	10 mM	10 mM	10 mM
H ₂ O	950 μL	40 μL	40 μL
ATP-Dinatriumsalz	1 mM	1 mM	1 mM
Substrat	2,0 mM	-	2,0 mM
12-MTS (gelöst in <i>n</i> -Hexan)			
NADPH-Tetranatriumsalz	-	0,2 mM	0,2 mM
jeweilige	-	900 μL	900 μL
CAR-Enzymlösung, $50 \mu\text{g mL}^{-1}$			

Die Aktivität der jeweiligen Enzyme wurde nach folgender Formel berechnet:

$$[U \cdot L] = \frac{(\Delta E_{Probe} - \Delta E_{Blind}) \cdot V_{gesamt} \cdot F}{V_{Probe} \cdot d \cdot \epsilon_{340nm}} \left[\frac{\mu mol}{min} \cdot L \right] \quad (Gl\ 1.3)$$

mit

V_{Ges} Volumen gesamt (1,02 mL)

F Verdünnungsfaktor

V_{Probe} Volumen der Enzymlösung (0,9 mL)

d Schichtdicke (1 cm)

ϵ_{340nm} Extinktionskoeffizient bei 340 nm ($6,3 \cdot 10^{-3} \text{ L } (\mu\text{mol} \cdot \text{cm})^{-1}$)

ΔE Extinktionsdifferenz

2.11.8 Untersuchung der Aktivität und der Spezifität der Lipase aus *Candida rugosa*

Um die Aktivität der Lipase aus *Candida rugosa* zu bestimmen, wurde der Lipase-Assay nach Winkler und Stuckmann verwendet. Hierbei hydrolysiert die Lipase das Nitrophenylsubstrat zu Nitrophenolat und der jeweiligen Säure (Abbildung 13). Alternativ wurde der Assay nach Purdy und Kolattukudy, welcher ähnlich dem Lipase-Assay verschiedene p-Nitrophenylderivaten bei einem anderen pH-Wert verwendet, genutzt um die Substratspezifität zu analysieren. Hierzu wurde eine Stammlösung der Lipase aus *Candida rugosa* von 12 mg/mL angesetzt.

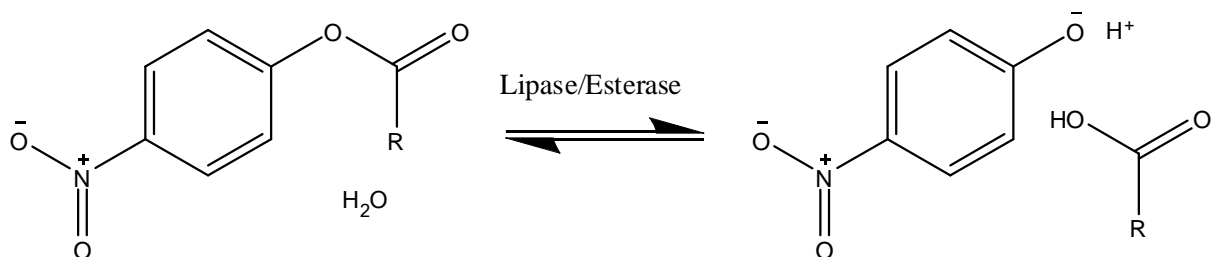


Abbildung 13: Hydrolyse von p-Nitrophenylsubstrat zu p-Nitrophenolat und der jeweiligen Säure

2.11.8.1 Assay auf Lipase-Aktivität nach Winkler und Stuckmann (1979)

Zur Bestimmung der Lipaseaktivität wurde p-Nitrophenoylpalmitat (pNPP) als Substrat verwendet. Es wurde eine 8 mM p-Nitrophenylpalmitatlösung (Substrat in Isopropanol) angesetzt. Nach Verdünnung der Probe mit Sørensenpuffer (pH = 8,0, 50 mM) wurde die Lösung für 10 min bei 37 °C inkubiert. Das Pipettierschema zur Bestimmung der Lipaseaktivität ist Tabelle 25 zu entnehmen.

Tabelle 25: Pipettierschema der Lipaseaktivität nach Winkler und Stuckmann 1

Lösung	Volumen [µL]
Probe	50
Substratlösung	200

Die Extinktionsänderung wurde mittels Plattenreader nach einem Zeitraum von 10 min bei 405 nm und 37 °C bestimmt.

Die Lipase Aktivität errechnet sich nach Gleichung 1.1:

$$U \cdot L^{-1} = \frac{\Delta E \cdot V_{Ges} \cdot F}{V_{Probe} \cdot \epsilon_{p-Nitrophenol, 405 \text{ nm}} \cdot d} \quad (\text{Gl 1.2})$$

mit

V_{Ges} Gesamtvolumen (0,25 mL)

V_{Probe} Volumen der Probe (0,05 mL)

$\epsilon_{p-Nitrophenol, 405 \text{ nm}}$ Extinktionskoeffizient von p-Nitrophenol bei 405 nm, pH = 7,5
(0,00985 L µmol⁻¹ cm⁻¹)

d Schichtdicke (0,8 cm)

ΔE Extinktionsdifferenz

F Verdünnungsfaktor

Ein U entspricht dabei der Enzymmenge, die 1 μmol p-Nitrophenolester pro Minute bei $\text{pH} = 8,0$ und $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ hydrolysiert.

Um die Substratspezifität der Lipase zu untersuchen, wurde die Untersuchung auf den Assay auf Esterase-Aktivität nach Purdy und Kolattukudy (1973) ausgeweitet – es handelt sich hierbei um analoge Substrate, jedoch unterscheiden sich diese in der Länge des Restes R (vgl. 2.11.8.1) bei Verwendung eines anderen Puffers.

2.11.8.2 Assay auf Esterase-Aktivität nach Purdy und Kolattukudy (1973)

Zur Bestimmung der Esteraseaktivität wurden p-Nitrophenylacetat (pNPA), -butyrat (pNPB), -valerat (pNBV) und -octanoat (pNBO) als Substrat verwendet. Es wurde eine 3,5 mM p-Nitrophenylcarboxylat-Lösung (Substrat in 96%igem Ethanol) angesetzt. Nach Verdünnung der Probe wird die Lösung für 10 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Das Pipettierschema zur Bestimmung der Esteraseaktivität ist Tabelle 26 zu entnehmen.

Tabelle 26: Zusammensetzung des Assay auf Esterase-Aktivität nach Purdy und Kolattukudy

Lösung	Volumen [μL]	Substrat
Probenlösung	20	
Kaliumphosphatpuffer ($\text{pH} = 7,0/ 80\text{ mM}$)	130	p-Nitrophenylacetat
Kaliumphosphatpuffer ($\text{pH} = 7,0/ 80\text{ mM}$), 0,5 % Triton X100	130	p-Nitrophenylbutyrat, -valerat bzw. -octanoat
3,5 mM p-Nitrophenylcarboxylat (1 eq 17,5 mM p-Nitrophenylcarboxylat in 96 % EtOH mit 4 eq Kaliumphosphatpuffer ($\text{pH} = 7,0/ 80\text{ mM}$)	50	

Sobald die Substratlösung zugegeben ist, startet die Reaktion (Abbildung 13: Hydrolyse von p-Nitrophenylsubstrat zu p-Nitrophenolat und der jeweiligen Säure (vgl. Abbildung 13).

Die Extinktionsänderung wurde mittels Plattenreader nach einem Zeitraum von 10 min bei 405 nm und 30 °C gemessen.

Die Esterase-Aktivität errechnet sich nach Gleichung 1.3:

$$U \cdot L^{-1} = \frac{\Delta E \cdot V_{Ges} \cdot F}{V_{Probe} \cdot \epsilon_{p-Nitrophenol, 405 \text{ nm}} \cdot d} \quad (\text{Gl 1.3})$$

mit

V_{Ges}	Gesamtvolumen (0,2 mL)
V_{Probe}	Volumen der Probe (0,02 mL)
$\epsilon_{p-Nitrophenol, 405 \text{ nm}}$	Extinktionskoeffizient von p-Nitrophenol bei 405 nm (0,00985 L $\mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
d	Schichtdicke (0,64 cm)
ΔE	Extinktionsdifferenz
F	Verdünnungsfaktor

Ein U entspricht dabei der Enzymmenge, die 1 μmol p-Nitrophenolester pro Minute bei pH = 7,0 und 30 °C hydrolysiert.

2.11.9 Umsetzung des Lipidextraktes aus *Conidiobolus heterosporus*

2.11.9.1 Kulturführung des Pilzes

Ausgehend von einer bewachsenen Agarplatte wurden runde Stücke des Pilzmyzels vom äußeren Rand der Wachstumszone mit einem Korkbohrer (5 mm Durchmesser) ausgestanzt und in 2-mL-Kryoröhrchen überführt. Für die Lagerung der Kulturen in Wasser wurde zu 10 ausgestanzten Agarstücken 1 mL Wasser hinzugegeben und die Röhrchen bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Für die Lagerung bei -80 °C sowie in flüssigem Stickstoff wurde anstelle des Wassers 1 mL Glycerol als Gefrierschutz verwendet. Bei Bedarf wurde zum Animpfen direkt ein Stück auf eine Agarplatte überführt (2.11.9.2).

2.11.9.2 Kulturführung auf Agarplatten

Ausgehend von der Stammsammlung des Instituts für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie (2.11.9.1) wurden die Pilze auf Malzextrakt-Hefeextrakt-Agarplatten kultiviert. Zur Herstellung der Platten wurden die Medienbestandteile eingewogen (Tabelle 27), mit destilliertem Wasser ad 1 Liter aufgefüllt und autoklaviert (120 °C, 20 min). Auf die Agarplatten wurde mittig ein 1 cm² großes, mit Myzel bewachsenes Agarstück aus dem vitalen Randbereich einer Plattenkultur, positioniert, die Petrischalen mit Parafilm verschlossen und anschließend bei 24 °C im Brutschrank inkubiert. Nach Bedarf wurden die Vorkulturen von den dann zu etwa dreiviertel bewachsenen Platten angeimpft (2.11.9.3). Parallel dazu wurden fortlaufend weitere Agarplatten für die nächsten Vorkulturen nach dem gleichen Prinzip beimpft.

Tabelle 27: Zusammensetzung des Malzextrakt-Hefeextrakt-Agars zur Anzucht von Pilzen

Medienbestandteil	Malzextrakt-Hefeextrakt-Agar
	Konzentration [g L ⁻¹]
Agar-Agar	15
Malzextrakt	30
Hefeextrakt	3
pH eingestellt mit 1M NaOH	5,6

2.11.9.3 Vorkulturführung submers

Für die submers geführten Vorkulturen wurde Malzextrakt-Hefeextrakt-Medium verwendet (vgl. Tabelle 27) jedoch ohne Agar-Agar. Für die Kultivierung in Submerskultur wurde ein 1 cm² großes Agarstück des äußeren Myzelrasens (2.11.9.2) unter sterilen Bedingungen in einen mit 100 mL Nährmedium befüllten 250-mL-Erlenmeyerkolben überführt und mit einem Ultraturrax-Dispergierstab behandelt (30 s, 10.000 U min⁻¹). Die Vorkulturen wurden bei 24 °C unter Lichtausschluss auf einem Inkubationsschüttler (Orbitron, Infors GmbH, Einsbach; 150 U min⁻¹, Auslenkung 25 mm) für 7 d inkubiert.

2.11.9.4 Hauptkulturführung submers

Die nach 2.11.9.3 angesetzten Kulturen wurden unter sterilen Bedingungen mittels Ultraturrax-Dispergierstab behandelt (30 s, 10.000 U min⁻¹) und in einem autoklavierten Dreihalskolben vereinigt. Die homogenisierte Vorkultur wurde über ein Septum mittels einer Animpfnadel in den Bioreaktor mit zwei dreiblättrigen-Propellerrührern ($\alpha = 45^\circ$) überführt (Abmessungen siehe Abbildung 14). Für die submers geführten Hauptkulturen wurde Malzextrakt-Hefeextrakt-Medium verwendet (Tabelle 27).

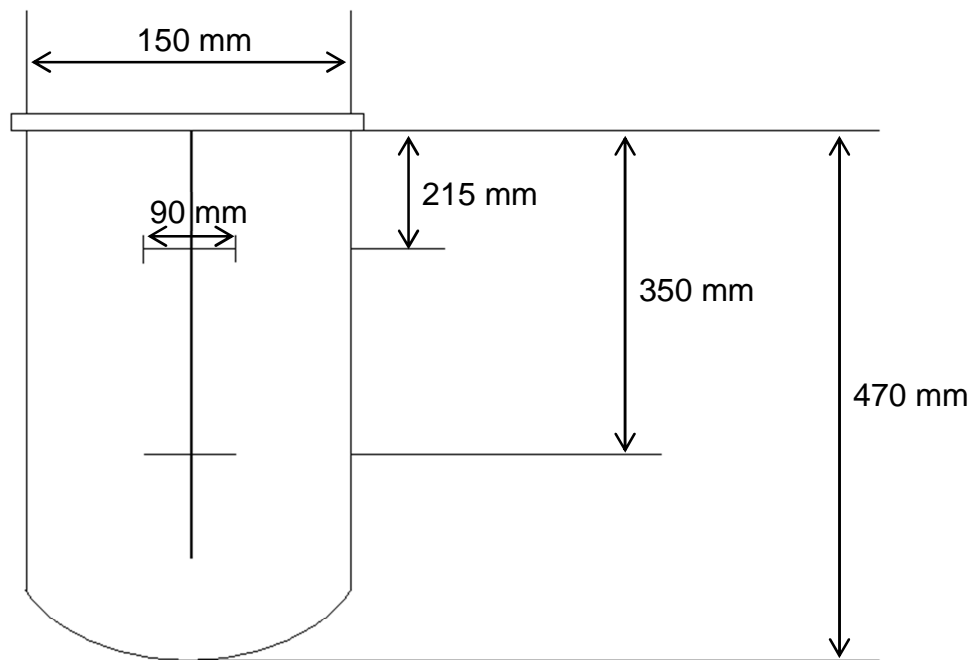


Abbildung 14: Maße des Fermenters und Position der Rührer im Fermenter (Labfors 3, Infors GmbH)

2.11.9.5 Isolierung der Lipide

Die Biofeuchtmasse (2.11.9.4) wurde bei -20 °C eingefroren und mittels Gefriertrocknungsanlage (Alpha 1-2 LD plus, Christ, Osterode am Harz) für 48 h getrocknet. Die lyophilisierte Trockenmasse wurde durch Mörsern mechanisch aufgeschlossen und anschließend in spezielle Extraktionshülsen (Soxtherm-Extraktionshülsen, 33 x 80 mm, Gerhardt, Königswinter) eingewogen und mit Glaswolle verschlossen. Die Extraktion erfolgte in der Soxtherm-Apparatur (Multistat, SE-146, Gerhardt, vgl. Tabelle 28) mit Petrolether (130 mL, niedrig siedend).

Tabelle 28: Extraktion des Lipidextraktes mittels Soxtherm-Apparatur (Multistat, Gerhardt, Königswinter)

Parameter	Wert
Petrolether (niedrig siedend)	130 mL
Extraktionstemperatur	150 °C
Absenintervall	4 min
Absenkimpuls	2 s
Kochphase	30 min
Abdestillieren nach Kochphase	3 Intervalle
Extraktionszeit	1 h 30 min
Abdestillieren nach Extraktion	5 Intervalle
Abdestillieren Ende	5 min
Programmdauer gesamt	2 h 37 min

Die anschließende Trocknung des Lipidextraktes erfolgte bei 105 °C im Trockenschrank bis zur Konstanz der Masse. Bis zur weiteren Verwendung wurde der Extrakt bei -20 °C gelagert.

2.11.9.6 Bestimmung der Fettsäuremethylesterverteilung (FSME) des Lipidextraktes von CHET-N

4 mL einer 0,5 M methanolischen Natriumhydroxidlösung wurden zu 150 mg eines aus CHET-N gewonnenen Lipidextraktes in *n*-Hexan gegeben und im Trockenschrank inkubiert (80 °C, 10 min). Nach Abkühlen auf Eis wurden 3,5 mL Bortrifluoridlösung (20%ig in Methanol) hinzugegeben, die Mischung geschüttelt und erneut im Trockenschrank inkubiert (80 °C, 5 min). Nach dem Abkühlen auf Eis wurden 5 mL *n*-Hexan hinzugegeben und die Lösung erhitzt (80 °C, 1 min). Anschließend wurden 3 mL gesättigte Kochsalzlösung zugesetzt, die Reaktionsmischung geschüttelt, die organische Phase abgenommen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. 1 µL der Probe wurde gaschromatographisch analysiert (2.11.10 und Tabelle 31).

2.11.9.7 Enzymatische Umsetzung des Lipidextraktes von CHET-N mit CAR

In einem 10 mL-Reaktionsgefäß wurden 150 mg CHET-N-Lipidextrakt zusammen mit 200 µL Lipaselösung (*Candida rugosa*; 12 mg mL⁻¹) und 1.010 µL der Reaktionsmischung (2.11.2.5, Tabelle 23) für 2 h bei 30 °C im Inkubationsschüttler (Ecotron, Infors; 250 U min⁻¹, Auslenkung 25 mm) inkubiert. Der Ansatz wurde mit 1 mL DCM extrahiert und anschließend wurde 1 µL der organischen Phase gaschromatographisch analysiert (2.11.10 und Tabelle 31).

2.11.9.8 Bestimmung der frei vorliegenden Fettsäuren mittels FSME

Um zu überprüfen, ob 12-Methyltridecansäure (12-MTS) bereits frei im Lipidextrakt vorliegt, wurden 108 mg (in 180 µL *n*-Hexan) des nach 2.11.9.5 gewonnenen Lipidextraktes mit 180 µL Phosphatpuffer (50 mM, pH= 7,5) versetzt und durchmischt. Die organische Phase wurde extrahiert und analog 2.11.9.6 behandelt. Die wässrige Phase wurde auf einen pH = 2 mit 18,5 %iger Salzsäure eingestellt und mit 180 µL *n*-Hexan extrahiert. Anschließend wurde der Extrakt der wässrigen Phase bis auf den Verseifungsschritt analog nach 2.11.9.6 behandelt.

2.11.10 Gaschromatographie

Tabelle 29: Parameter und Bedingungen für die gaschromatographische Analyse der Umsetzungen mittels (GC-FID)

Gaschromatograph	Agilent 7890A (Agilent Technologies)
Stationäre Phase	HP-InnoWAX, 30 m x 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke (Agilent Technologies)
Trärgas	Wasserstoff (5.0), 2,0 mL min ⁻¹ (konstant)
Autosampler	Agilent 7893A (Agilent Technologies)
Injektor	<i>split/splitless</i> -Inlet, 250 °C (Agilent Technologies)
Probenaufgabe	1 µL Injektionsvolumen, <i>split</i> 5:1
Temperaturprogramm	40 °C (4 min), 5 °C min ⁻¹ auf 240 °C (16 min)
Detektor	FID, 250 °C; Gase: H ₂ : 40 mL min ⁻¹ , Luft: 400 mL min ⁻¹ , N ₂ : 25 mL min ⁻¹
Software	Chemstation B.04.01

Um die Geruchseindrücke zu analysieren, wurde ein Gaschromatograph mit einem olfaktorischen Port (GC-O) benutzt (Tabelle 30).

Tabelle 30: Parameter und Bedingungen der Gaschromatographie mit olfaktorischen Port (GC O) mit FID

Gaschromatograph		Agilent 7890A (Agilent Technologies)
Stationäre Phase		HP-InnoWAX, 30 m x 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke (Agilent Technologies)
Trärgas		Wasserstoff (5.0), 2,0 mL min ⁻¹ (konstant)
Injektor		<i>Cold on-column</i>
Probenaufgabe		0,1 µL Injektionsvolumen, <i>splitless</i>
Temperaturprogramm		40 °C (4 min), 5 °C min ⁻¹ auf 240 °C (16 min)
Detektor		FID, 250 °C; Gase: H ₂ : 40 mL min ⁻¹ , Luft: 400 mL min ⁻¹ , N ₂ : 25 mL min ⁻¹
Olfaktometrieport (ODP)		Gerstel ODP 3 (Gerstel, Mühlheim an der Ruhr), Transferline 250 °C, Mischraumheizung 150 °C, Makeupgas N ₂ , Spracherkennungssoftware Dragon Naturally Speaking 10 (Nuance, Burlington, USA)
Software		Chemstation B.04.01

Tabelle 31: Parameter und Bedingungen für die gaschromatographische Analyse der Umsetzungen mittels GC-FID

Gaschromatograph	Agilent 7890A (Agilent Technologies)
Stationäre Phase	HP-INNOWax 30 m x 0,32 mm ID, 0,25 µm Filmdicke
Trärgas	Wasserstoff, 2 mL min ⁻¹ (konstant)
Probenaufgabe	Flüssig, Split 1:10
Injektor	<i>split/splitless</i> -Inlet, 250 °C
Temperaturprogramm	40°C (3 min), 3 °C min ⁻¹ auf 240 °C (12 min)
Detektor	Agilent MSD 5795C FID (Agilent Technologies)
Detektor-Temperaturen	FID 250 °C
Software	Chem Station Rev. B.04.01[481]

Tabelle 32: Parameter und Bedingungen für die gaschromatographische Analyse des Funktionstests mittels GC-MS

Gaschromatograph	Agilent 7890A (Agilent Technologies)
Stationäre Phase	Agilent DB-5MS 30 m x 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke
Trärgas	Wasserstoff, 2 mL min ⁻¹ (konstant)
Probenaufgabe	Flüssig, Split a) 10:1 b) 20:1
Injektor	<i>split/splitless</i> -Inlet, 250 °C
Temperaturprogramm	40°C (3 min), 5 °C min ⁻¹ auf 300 °C (12 min)
Detektor	Agilent MSD 5795C Triple Axis Detector (Agilent Technologies)
Detektor-Temperaturen	Ionenquelle 230 °C, Quadrupol 150 °C, Transferline 250 °C
Software	MassHunter Qualitative Analysis B.06.00/ Build 6.0.633.10 MassHunter Quantitative Analysis B.07.00/ Build 7.0.457.0
Datenbank	NIST 2011 MS

Tabelle 33: Parameter und Bedingungen für die gaschromatographische Analyse mittels GC-MS

Gaschromatograph	Agilent 7890A (Agilent Technologies)
Stationäre Phase	Agilent VF-Wax 30 m 250 µm ID, 0,25 µm Filmdicke
Trägergas	Wasserstoff, 2 mL min ⁻¹ (konstant)
Probenaufgabe	Flüssig, Split 1:10
Injektor	<i>split/splitless</i> -Inlet, 250 °C
Temperaturprogramm	40°C (3 min), 3 °C min ⁻¹ auf 240 °C (13 min)
Detektor	Agilent MSD 5795C Triple Axis Detector (Agilent Technologies)
Detektor-Temperaturen	Ionenquelle 230 °C, Quadrupol 150 °C, Transferline 250 °C
Software	MassHunter Qualitative Analysis B.06.00/ Build 6.0.633.10 MassHunter Quantitative Analysis B.07.00/ Build 7.0.457.0
Datenbank	NIST 2011 MS

2.12 Entsorgungshinweis

Lösungsmittelreste und andere Chemikalienabfälle wurden nach folgendem Schema getrennt gesammelt und der Entsorgung der Justus-Liebig-Universität Gießen zugeführt.

- Organische Abfälle
- Anorganische Abfälle

Glasabfälle und kontaminierte Betriebsmittel wurden in separaten Tonnen gesammelt und ebenfalls der Entsorgung der Justus-Liebig-Universität Gießen zugeführt.

2.12.1 Biologisches Material

Die genetisch modifizierten *E. coli* Zellen wurden ausschließlich in S1-Laboratorien bearbeitet. Alle Laborgeräte wurden nach Gebrauch mit 70%igem Ethanol desinfiziert und die Kulturüberstände, sowie die benötigten Agarplatten autoklaviert.

Ergebnisse

2.13 Expressionskulturen der *E. coli*-Stämme

2.13.1 *E. coli*-Stämme mit DOX codierenden Plasmiden

Die nach 2.8.1 kultivierten Zellen erzielten folgende Biofeuchtmassen (BFM):

Tabelle 34: Biofeuchtmasse der DOX-exprimierenden Zellen

Stamm	Exprimiertes Enzym	BFM
pET28a(+)- α -DOX	α -DOX aus Reis (<i>Oryza sativa</i>)	10,1 g L ⁻¹
pET28a- α -DOX <i>Cyanothece</i> sp.	α -DOX aus <i>Cyanothece</i> sp.	12,4 g L ⁻¹

2.13.2 *E. coli*-Stämme mit CAR codierenden Plasmiden

Nach ca. 18 h, mit einer OD₆₀₀ = 0,6 - 0,7, konnten folgende BFM der einzelnen Zellen bestimmt werden:

Tabelle 35: Biofeuchtmasse der CAR-exprimierenden Zellen

Stamm	Exprimiertes Enzym	BFM
pT-PC2	CAR aus <i>Mycobacterium</i> <i>marinum</i> + Phosphopantetheinyl- transferase (PPT) aus <i>Bacillus subtilis</i>	27,6 g L ⁻¹
MmFad9:NC_010612.1	CAR aus <i>Mycobacterium</i> <i>marinum</i>	20,1 g L ⁻¹
Nsp_CAR:AY495697.1	CAR aus <i>Nocardia spec.</i>	22,5 g L ⁻¹

2.13.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Bilanzierung wurde die Proteinkonzentration der drei Enzyme bestimmt und eine Konzentration (bestimmt nach 2.8.5) von $614,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ für die CAR aus dem *Mycobacterium marinum*, welche mittels Phosphopantetheinyl-transferase (PPT) aktiviert wurde, erreicht. Für die CAR aus *Mycobacterium marinum*, welche nicht mittels PPT aktiviert wurde, betrug die Konzentration $1580,7 \mu\text{g mL}^{-1}$. Von der CAR, welche aus *Nocardia* sp. stammte und nicht mittels PPT aktiviert wurde, konnten $796,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ isoliert werden.

Die nach 2.8.4 isolierten Enzymlösungen wurden für die jeweiligen Versuche verdünnt, sodass jeweils eine Konzentration von $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ und eine Konzentration von $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ zur Verfügung stand.

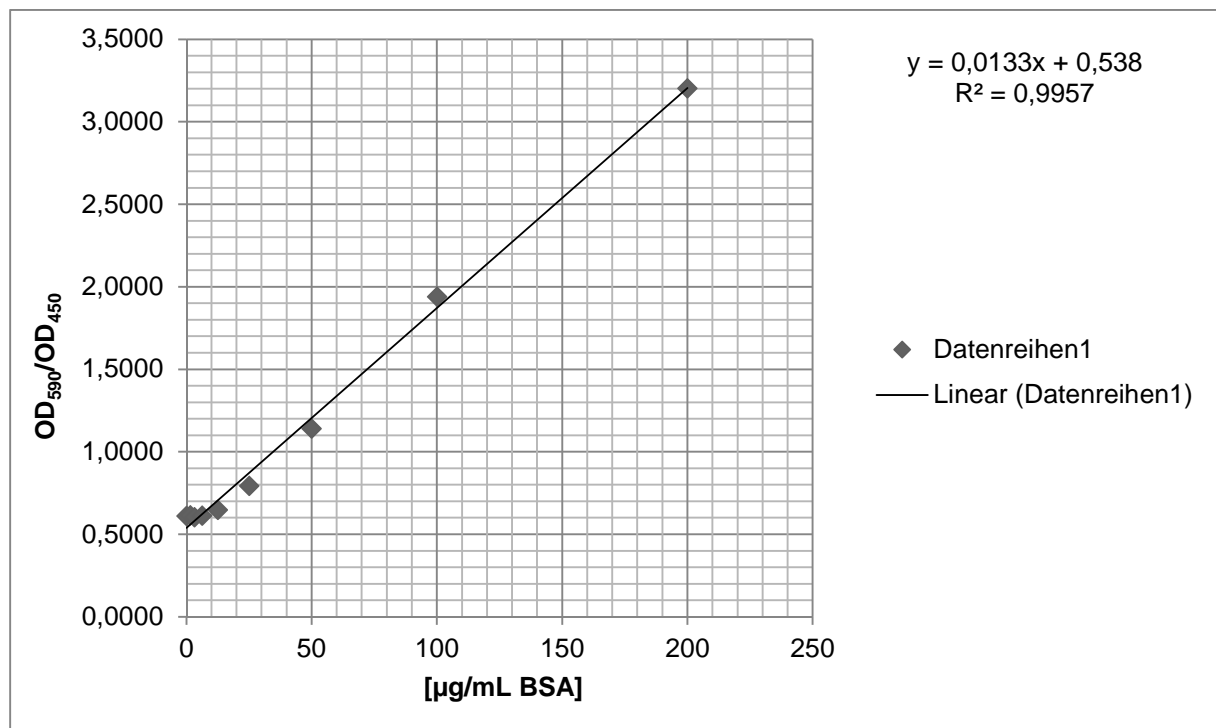


Abbildung 15: Kalibriergerade des Bradford-Assays

Tabelle 36: Proteinkonzentrationen der einzelnen CARs

Stamm	Proteinkonzentration
pT-PC2	$614,6 \mu\text{g mL}^{-1}$
MmFad9:NC_010612.1	$1580,7 \mu\text{g mL}^{-1}$
Nsp_CAR:AY495697.1	$796,1 \mu\text{g mL}^{-1}$

2.14 Transformation der Plasmide

2.14.1 Transformation von pET28a(+) mit und ohne DOX in *E. coli*-Zellen

Das Wachstum der *E. coli*-Zellen auf kanamycinhaltigen Agarplatten zeigte, dass die Transformation der Plasmide mit Kanamycinresistenz erfolgreich verlief (Abbildung 16).

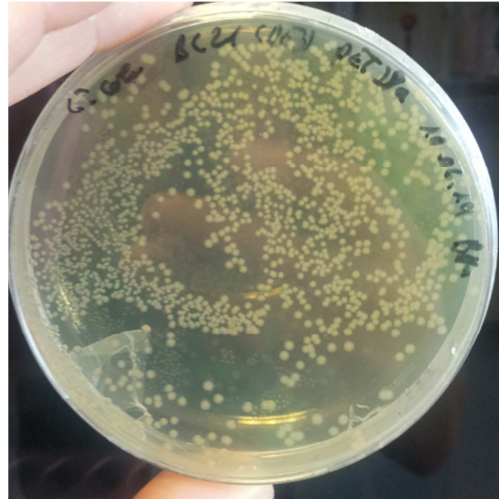


Abbildung 16: Erfolgreiche Transformation von pET28a(+) in BLD21(DE3); Wachstum auf einer kanamycinhaltigen LB-Agar-Platte (25 mg mL^{-1}); Inkubation über Nacht bei 37°C

Im Anschluss wurden einzelne Klone auf eine Masterplatte übertragen und bei 37°C über Nacht inkubiert.

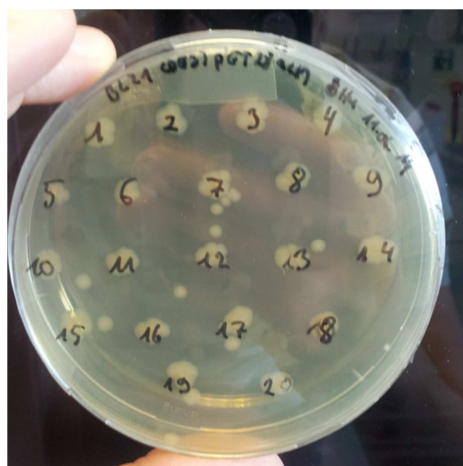


Abbildung 17: Masterplatte der selektierten Klone nach erfolgter Inkubation

2.15 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

2.15.1 SDS-PAGE der DOX

Um den positiven Expressionsverlauf verfolgen zu können, wurde vor und nach der Induktion von pET28a(+)- α -DOX (α -DOX aus *Oryza sativa*) und BL21(DE3)pET28a- α -DOX *Cyanothece* sp. ein Aliquot der Kulturbrühe von 250 μ L entnommen und mittels SDS-PAGE analysiert (2.10.1).

Auf der Höhe von ca. 75 kDa wurde in den Proben von pET28a(+)- α -DOX (α -DOX aus *Oryza sativa*) und BL21(DE3)pET28a- α -DOX *Cyanothece* sp. eine Bande identifiziert (Abbildung 18 und Abbildung 19). Die Proben, welche vor der Induktion entnommen wurden, zeigten eine schwache - kaum sichtbare - Bande bei 70 kDa. Native BL21(DE3) Zellen exprimierten auch ein Protein mit einem ähnlichen Molekulargewicht, welches allerdings keine DOX-Aktivität zeigte. Eine SDS-PAGE mit den Wildtyp BL21(DE3)-Zellen ohne Plasmid bestätigte diese Hypothese (Abbildung 20). Die Säuren konnten durch den Wildtyp nicht umgesetzt werden.

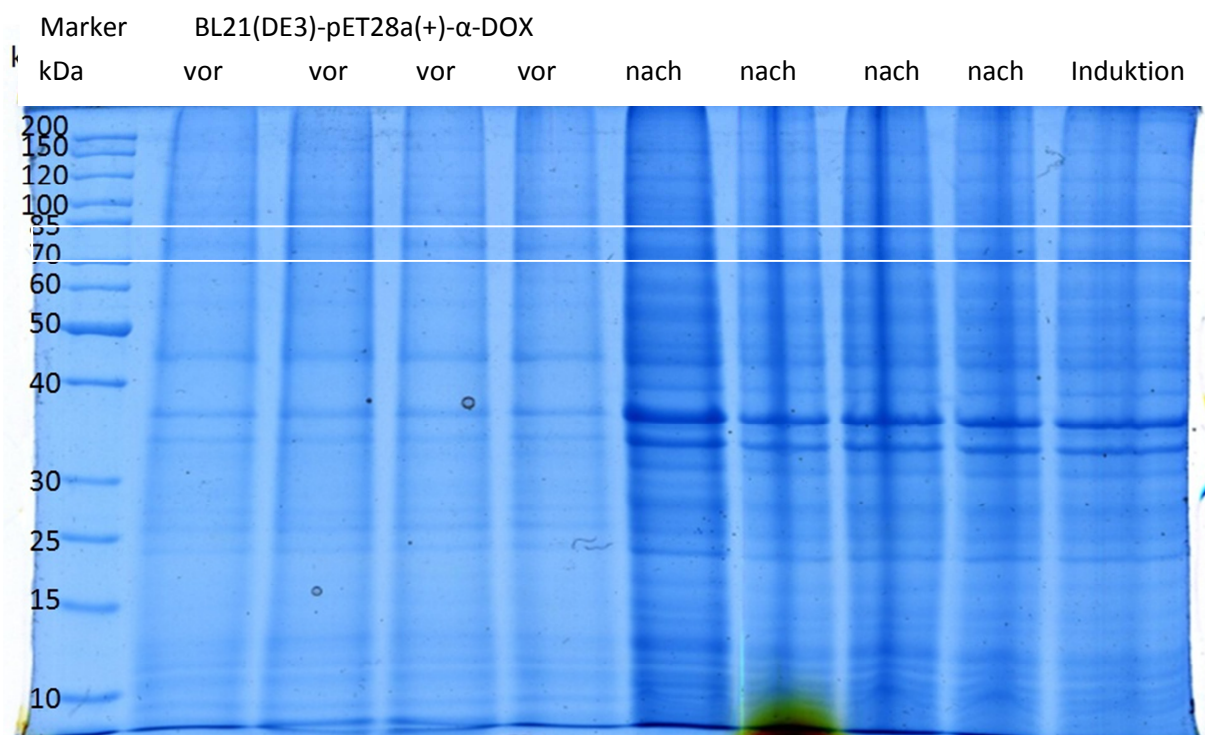


Abbildung 18: SDS-PAGE der Expressierung von BL21(DE3)-pET28a(+)- α -DOX; (links vor IPTG Zugabe, rechts nach Induktion, Markierung der Bande bei ca. 75 kDa)

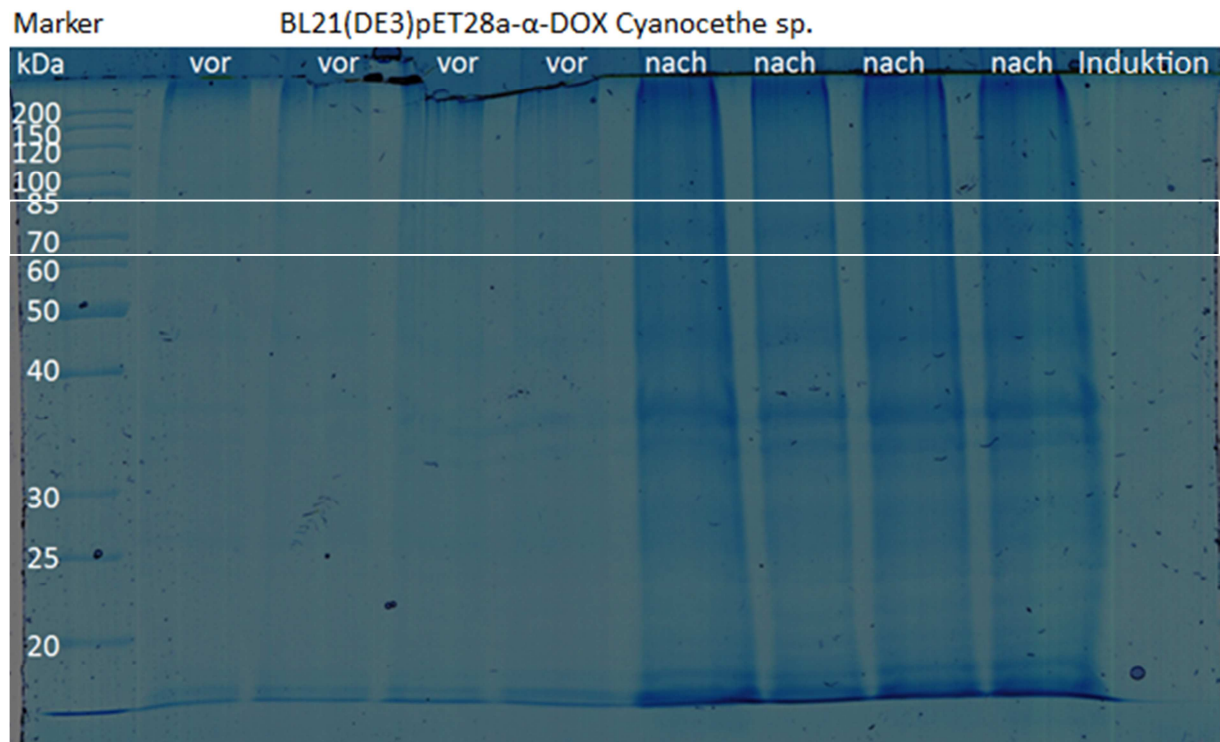


Abbildung 19: SDS-PAGE der Exprimierung von BL21(DE3)pET28a- α -DOX Cyanocethe sp. (links vor IPTG Zugabe, rechts nach Induktion; Markierung der Bande des Enzyms bei ca. 75kDa)

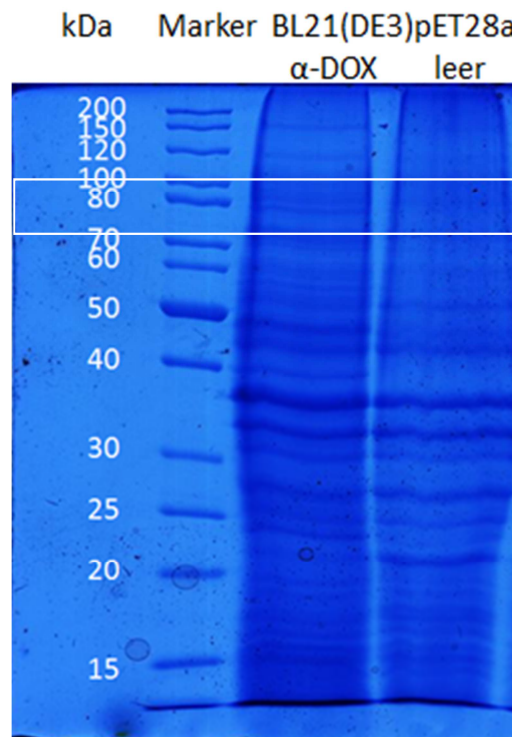


Abbildung 20: SDS-PAGE des Stammes BL21(DE3)pET28a- α -DOX Cyanocethe sp. und des Kontrollstammes ohne das Insert des α -DOX Cyanocethe sp. (Markierung der Bande bei ca. 75kDa entspricht der heterolog exprimierten DOX aus Cyanocethe sp.)

2.15.2 SDS-PAGE der CAR

Nach heterologer Expression der CAR (2.8.2) konnte das Enzym mithilfe eines Protino-Ni-TED-Kits (2.8.3) selektiv isoliert werden. Das Molekulargewicht der Reduktase betrug ca. 128 kDa (Abbildung 22) (Akhtar, Turner und Jones). Weitere Banden wurden nicht beobachtet.

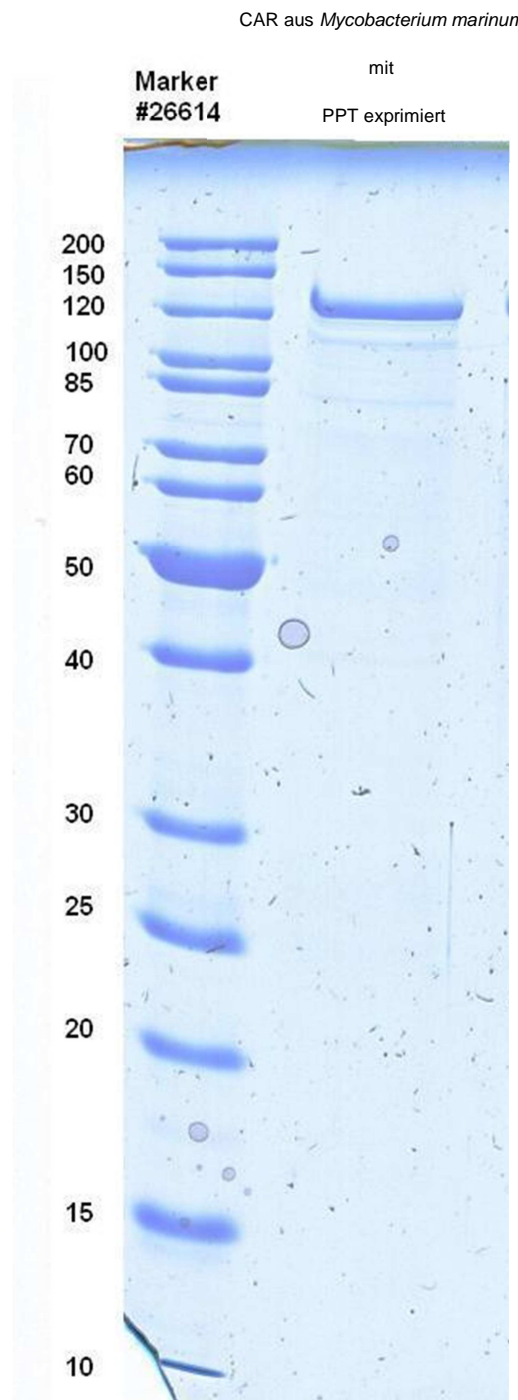


Abbildung 21: SDS-PAGE der isolierten CAR (Akhtar, Turner und Jones) mit Protino-Ni-TED-Kit

Analog konnten die anderen beiden CARs mithilfe eines Protino-Ni-TED-Kits (2.8.3) selektiv isoliert werden. Das Molekulargewicht der Reduktase betrug ca. 128 – 131 kDa (Tabelle 37) Weitere Banden wurden auch hier nicht beobachtet.

Tabelle 37: Molekulargewichte der verwendeten Reduktasen

Stamm	Exprimiertes Enzym	Molekulargewicht
pT-PC2	CAR aus <i>Mycobacterium marinum</i> + Phosphopantetheinyl- transferase (PPT) aus <i>Bacillus subtilis</i>	127,8 kDa
MmFad9:NC_010612.1	CAR aus <i>Mycobacterium marinum</i>	131 kDa
Nsp_CAR:AY495697.1	CAR aus <i>Nocardia spec.</i>	132 kDa

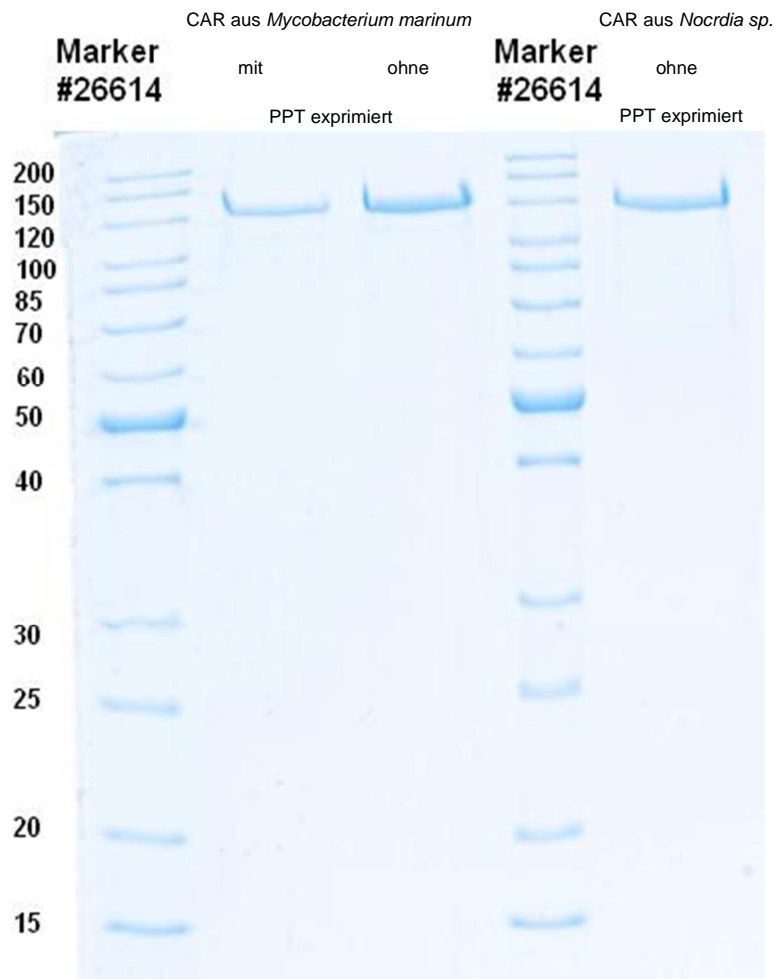


Abbildung 22: SDS-Page der isolierten Enzymfraktionen (2.13.3); jeweils 100 µg mL⁻¹

2.16 Enzymatische Umsetzungen

2.16.1 Enzymatische Oxidation mittels α -Dioxygenase

Die Quantifizierung der einzelnen Analyten erfolgte durch eine externe Kalibrierung (vgl. Abbildung 24).

Zur Absicherung der Umsetzung wurden die Substrate auf das Vorhandensein der Zielprodukte (C_{n-1}-Aldehyd) mittels GC-MS untersucht (siehe Tabelle 29). Keine der verwendeten Fettsäuren war mit dem jeweiligen Aldehyd in signifikanten Mengen verunreinigt. Beispielhaft sind in den folgenden Abbildungen der Substratblindwert des Substrates 13-Methyltetradecansäure (Abbildung 23) und die Biotransformation (Abbildung 24) selbiger dargestellt.

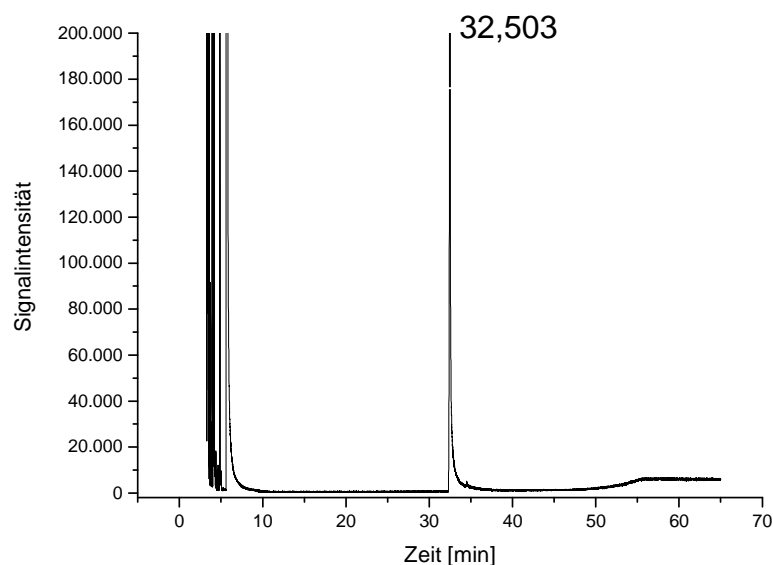


Abbildung 23: GC-MS-Chromatogramm (DB-5MS) der 13-Methyltetradecansäure (32,503 min)

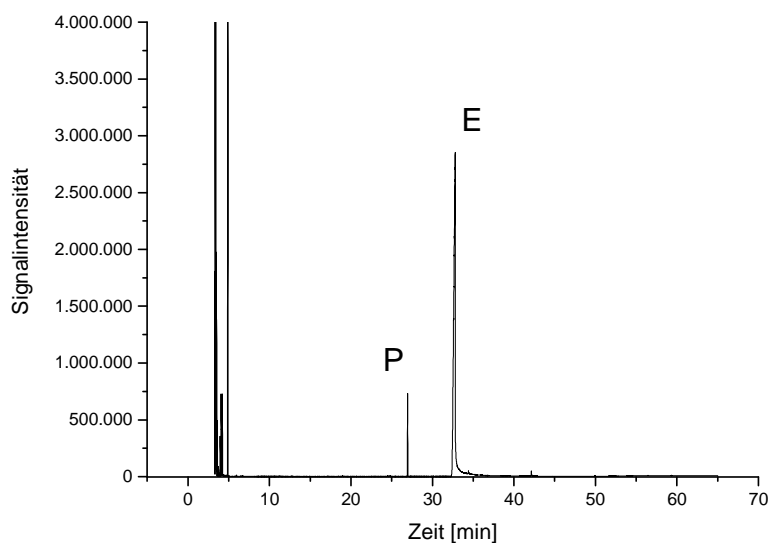


Abbildung 24: GC-MS-Chromatogramm (DB-5MS) des organischen Extrakts der Umsetzung von 13-Methyltetradecansäure (Edukt, E) zu 12-Methyltridecanal (Produkt, P)

Sowohl durch die abgekochten BL21(DE3)pET28a- α -DOX-, BL21(DE3)pET28a(+)- α -DOX *Cyanotheca* sp. - Zellen (analog 2.11.1.2) als auch durch die abgekochten BL21(DE3)pET28a(+)-Zellen konnte kein Produkt generiert werden.

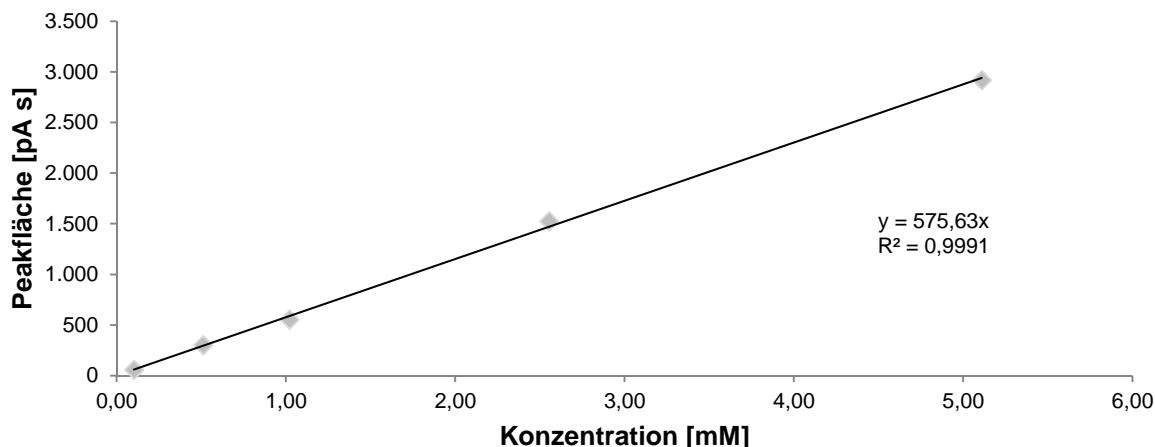


Abbildung 25: Kalibriergerade für 11-Methyltridecanal

(sonstige Aldehyde: siehe Anhang)

Die Umsetzung der einzelnen Säuren erfolgte nach 2.11.1. Nach 3 h wurden die höchsten Umsätze der Biotransformation mit beiden Enzymen erreicht (Abbildung 27 und Abbildung 26).

Die DOX aus Reis zeigte mindestens 20% Umsatz der einzelnen Substrate. Nach 3 h wurde der größte Umsatz von Tetradeconsäure zu Tetradeccanal mit 66% erreicht. Die Umsetzungen von 14-Methylpentadecansäure zu 13-Methyltetradeccanal und 12-Methyltetradeccansäure zu 11-Methyltrideccanal erreichten jeweils 62%.

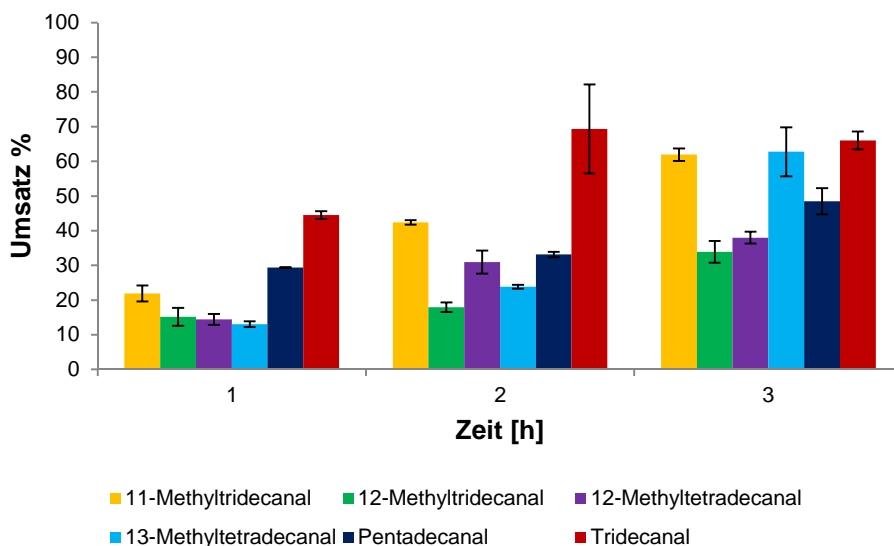


Abbildung 26: Prozentualer Umsatz der Biotransformation mit BL21(DE3)pET28a-α-DOX

Die Umsätze betrugen bei der DOX aus *Cyanothece* sp. jeweils über 50%. Das beste Ergebnis der Biotransformation erreichte die Umsetzung von 14-Methylpentadecansäure zu 13-Methyltetradecanal mit 94% und 12-Methyltetradecansäure zu 11-Methyltridecanal mit 86%.

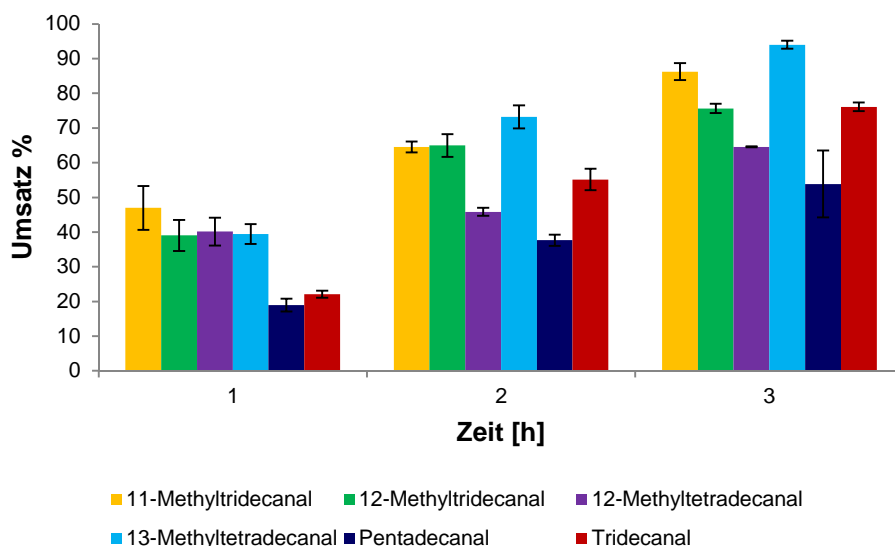


Abbildung 27: Prozentualer Umsatz der Biotransformation mit BL21(DE3)pET28a- α -DOX *Cyanothece* sp.

2.16.2 Olfaktorische Messung

Die resultierenden Eindrücke sind in Tabelle 38 zusammengefasst. Hierbei wurde, sofern vorhanden, neben dem Produkt der Biotransformation auch der Referenzstandard olfaktorisch analysiert.

Tabelle 38: Bestimmung der Geruchseindrücke

Substanz	Geruchseindruck Produkt	Geruchseindruck Standard
13-Methyltetradecanal	-	würzig, ganz schwach
12-Methyltridecanal	würzig, Suppe	würzig, Suppe, chemisch
11-Methyldodecanal	chemisch	
12-Methyltetradecanal	-	-
11-Methyltridecanal	leicht würzig, chemisch	-
10-Methyldodecanal	chemisch, lang anhaltend	
Pentadecanal	-	-
Tridecanal	chemisch kurzanhaltend	-

Von den Aldehyden 11-Methyldodecanal und 10-Methyldodecanal lagen keine Referenzstandards vor.

2.16.3 Enzymatische Umsetzung mittels CAR

2.16.4 Funktionstest

Nach Inkubation von Undecansäure mittels heterolog in *E. coli* exprimierter CAR (2.8.3) wurde Undecanal in den Transformationsansätzen eindeutig nachgewiesen (Abbildung 28).

Die Blindproben (2.11.5.1) – sowohl mit Hitze inaktiviertem Protein, als auch ohne Proteinzusatz – zeigten hingegen keine Umsetzung.

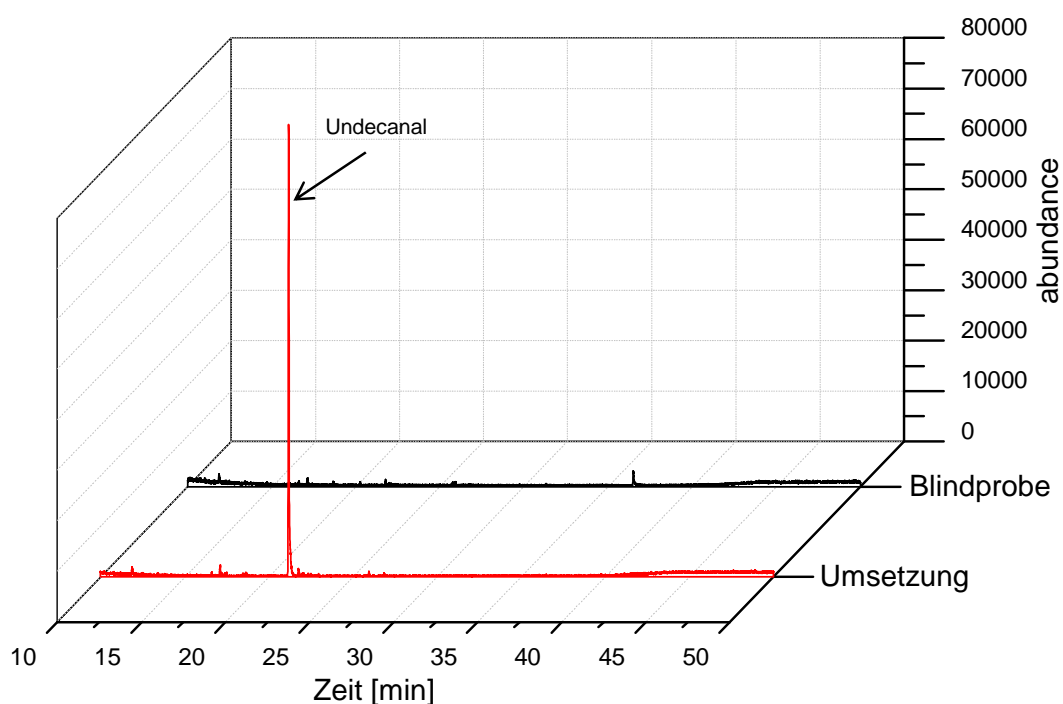


Abbildung 28: MS/MS-Chromatogramme (TIC, Scan in Q1) des organischen Extrakts der Umsetzung von Undecansäure (unten) und – stellvertretend für beide Blindwerte – des Transformationsansatzes mit inaktiviertem Enzym (Blindwert 1, oben); für Parameter siehe Tabelle 32a

Das erhaltene Massenspektrum von Undecanal (Abbildung 29) wies eine sehr hohe Übereinstimmung mit dem Spektrum der NIST-Datenbank auf.

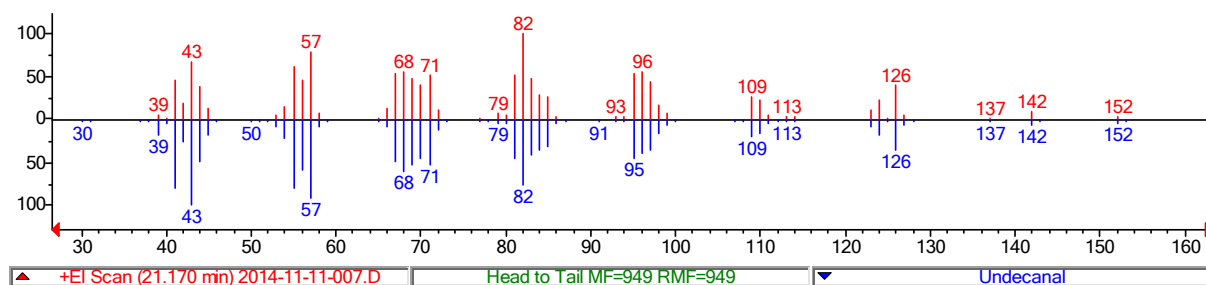
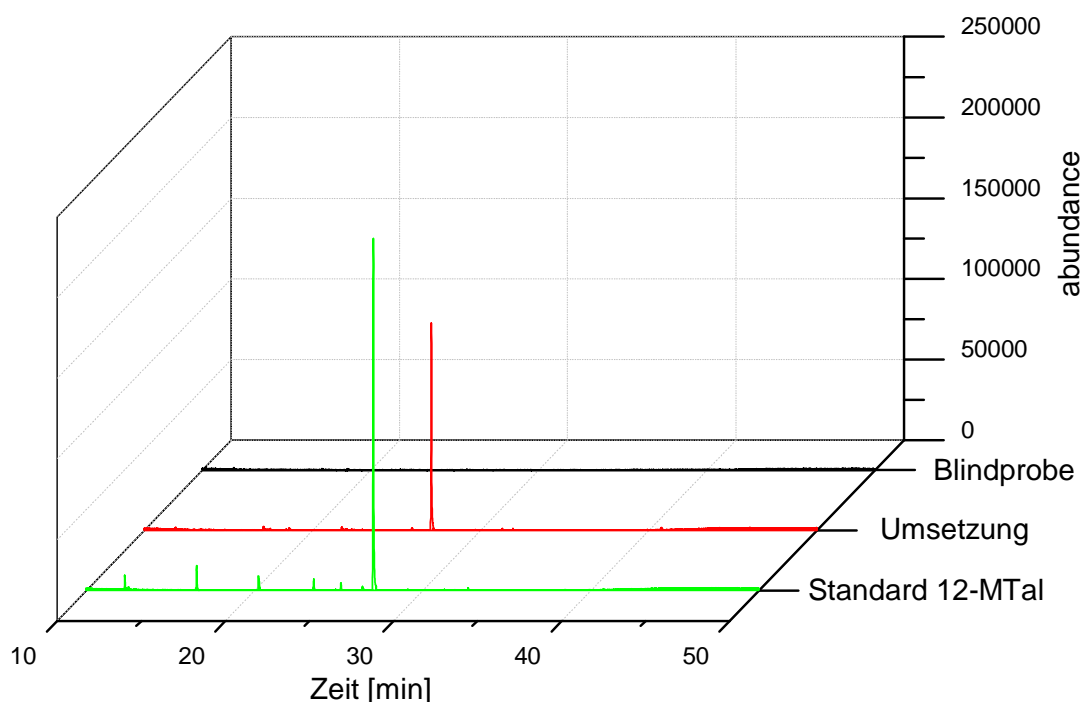


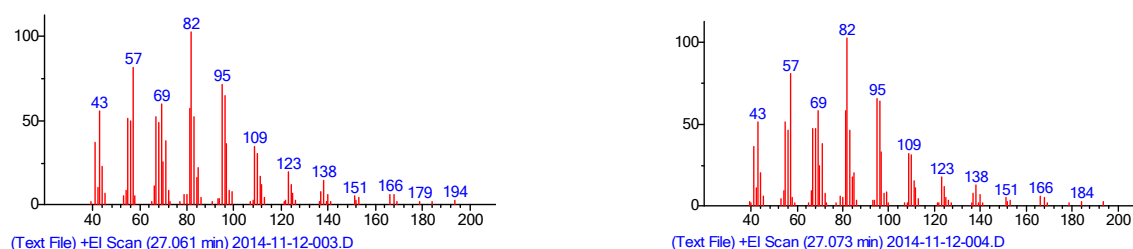
Abbildung 29: Massenspektrum des Transformationsproduktes (oben) im Vergleich zum Massenspektrum von Undecanal der NIST-Datenbank (unten); für Parameter siehe Tabelle 32a

Die Umsetzung der 12-MTS unter den gleichen Bedingungen mittels CAR zeigte ebenfalls die Bildung des gewünschten Reduktionsproduktes 12-MT_{al} (Abbildung 30). Erneut wurden in beiden Blindwerten keine Umsetzungsprodukte detektiert. Aufgrund des leicht basischen pH-Wertes des gewählten Transformationspuffers konnte nach der flüssig/flüssig-Extraktion ggf. nicht umgesetztes Substrat in der organischen Phase nicht nachgewiesen werden.



**Abbildung 30: oben: MS/MS-Chromatogramm (TIC, Scan in Q1) des Blindwertes 1 des organischen Extrakts der Umsetzung von 12-Methyltridecansäure;
mittig: Umsetzung von 12-Methyltridecansäure durch CAR;
unten: 12-Methyltridecanal-Standard; für Parameter siehe Tabelle 32a**

Das generierte Massenspektrum des Transformationsproduktes (Abbildung 31) zeigte eine sehr hohe Übereinstimmung mit dem Spektrum des authentischen Standards von 12-MTAl. Die Retentionsindizes stimmten sowohl auf einer polaren als auch auf einer unpolaren Säule mit dem der Standardsubstanz und Literaturdaten überein (vgl. Tabelle 41). Das detektierte Transformationsprodukt wurde somit zweifelsfrei als 12-MTAl identifiziert.



**Abbildung 31: links: Massenspektrum von 12-Methyltridecanal generiert aus der homologen Säure durch Reduktion mittels CAR;
rechts: Massenspektrum des Standards von 12-Methyltridecanal; für Parameter siehe Tabelle 32a**

2.16.5 Bilanzierung der enzymatischen Umsetzung mittels CAR

2.16.5.1 Synthese von 12-Methyltridecanol

Es konnten 1,684 g (90%) eines klaren Öles isoliert werden.

$^1\text{H-NMR}$: δ : 0,86 (d, 6H, $J = 6,6$ Hz), 1,13-1,2 (m, 2H), 1,25-1,37 (m, 16H), 1,49-1,56 (m, 3H), 3,63 (t, 2H, $J = 6,6$ Hz)

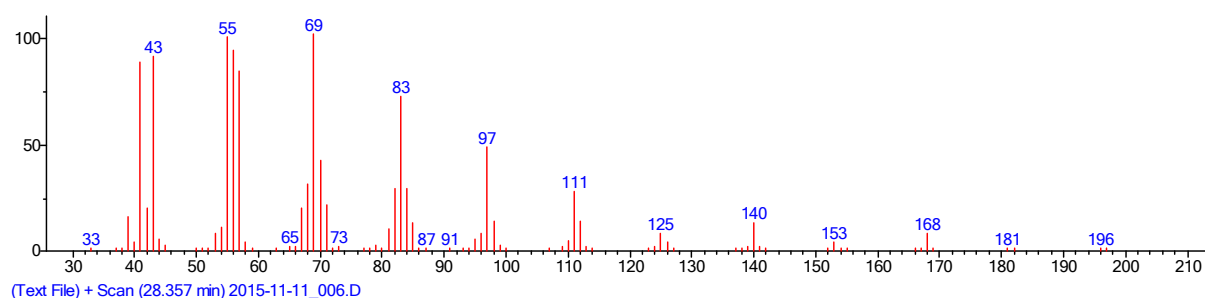


Abbildung 32: Massenspektrum des synthetisch hergestellten 12-Methyltridecanols; für Parameter siehe Tabelle 33

2.16.5.2 Synthese von 12-Methyltridecanal

Es konnten 199,0 mg (34%) eines gelben Öles mit charakteristischem Geruch nach Fleischwürze isoliert werden.

$^1\text{H-NMR}$: δ : 0,86 (d, 6H, $J = 6,6$ Hz), 1,13-1,2 (m, 2H), 1,25-1,29 (m, 14H), 1,46-1,56 (m, 1H), 1,58-1,66 (m, 2H), 2,39-2,43 (dt, 2H, $J = 5,5/1,9$ Hz), 9,76 (t, 1H, $J = 1,9$ Hz)

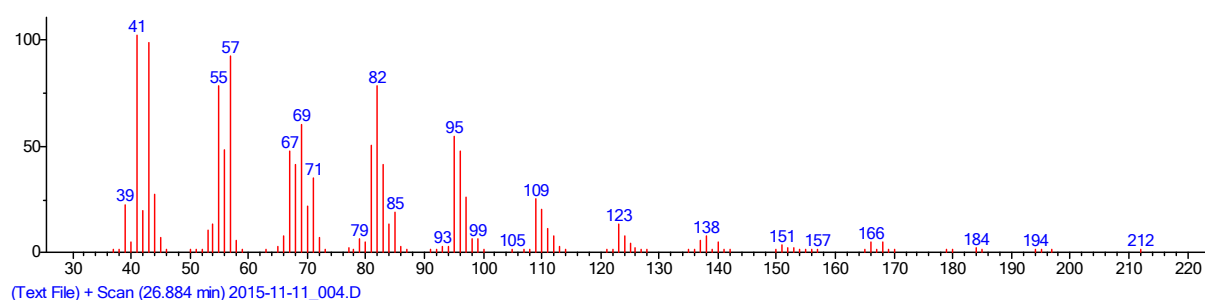


Abbildung 33: Massenspektrum des synthetisch hergestellten 12-Methyltridecanals; für Parameter siehe Tabelle 33

Zur Identifizierung der synthetisierten Substanzen (2.16.5.1 und 2.16.5.2) und dem Abgleich der Spektren wurden die Arbeiten von Yuasa *et al.* (Yuasa und Haruki 2004) und Dickshaft *et al.* (Dickshaft 2005) verwendet; die Stoffe konnten als 12-MTol und 12-Mal identifiziert werden.

2.16.5.3 Reinheit der Standards

Die mittels Gaschromatographie ermittelte Reinheit der Substanzen betrug für 12-MTol 96%, für 12-MTal 93%.

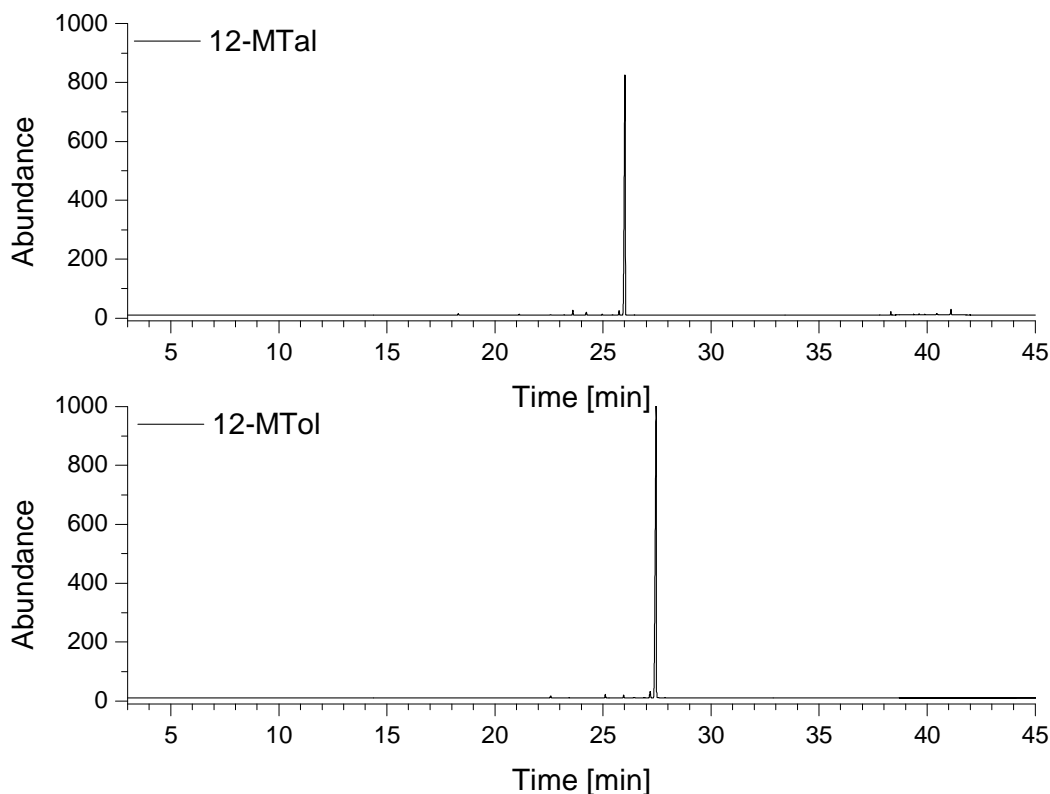


Abbildung 34: Chromatogramm der synthetisch hergestellten Substanzen 12-MTol (unten) und 12-MTal (oben); für Parameter siehe Tabelle 32a

2.16.6 Bestimmung der Responsefaktoren

12-MTS wurde mittels eines Responsefaktors für 11-MTS bestimmt. Die Wahl fiel auf 11-MTS, aufgrund seiner hohen Homologie zu 12-MTS und dem Fehlen in der Fettsäureverteilung des Pilzes CHET-N. Der Responsefaktor von 11-MTS zu 12-MTS wurde zu $0,93 \pm 0,02$ bestimmt.

Mit den synthetisierten Standards wurden die jeweiligen Responsefaktoren von (Z)-7-Decenal zu 12-MTal sowohl zu 12-MTol bestimmt, die Reinheiten der Substanzen wurden bei der Berechnung berücksichtigt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 39 zusammengefasst.

Tabelle 39: Zusammenfassung der experimentell bestimmten Responsefaktoren 2.11.4.3

Substanzen des jeweiligen Rf	Rf
11-MTS zu 12-MTS	0,93 ± 0,02
(Z)-7-Decenal zu 12-MTol	1,05 ± 0,04
(Z)-7-Decenal zu 12-MTol	0,62 ± 0,03

2.17 Ganzzellkatalyse der CAR-exprimierenden

E. coli-Stämme

Nach 24 h konnten weder bei eingesetzten 25 mg, noch bei 125 mg des Zellpellets von dem *E. coli*-Stamm, welcher CAR aus *Mycobacterium marinum* und die Phosphopantetheinyl-transferase (PPT) aus *Bacillus subtilis* exprimierte, 12-MTol identifiziert werden. Es wurden dennoch bis zu 28% 12-MTol generiert.

Ebenso konnten bei den Ansätzen, bei welchen der CAR aus *Mycobacterium marinum* exprimierende *E. coli*-Stamm verwendet wurde, lediglich bis zu 21% 12-MTol identifiziert werden.

Gleiches galt für die Ganzzellkatalyse mit dem CAR exprimierenden Stamm aus *Nocardia spec.* Die Ausbeute an 12-MTol erreichte hier maximal 23%.

2.17.1 Kinetik der Ganzzellkatalyse

Die 24 stündige Umsetzung zeigte als Produkt nur 12-MTol. Die Möglichkeit, dass bereits gebildetes 12-MTol direkt durch endogene Hydrogenasen von *E. coli* reduziert werden, wurde in Betracht gezogen und somit der Zeitraum der Umsetzung verkürzt und in Abständen von 1 h, 2 h, 4 h und 6 h untersucht, um bereits gebildetes 12-MTol detektieren zu können. Es wurden analog zur 24 stündigen Umsetzung 25 mg der jeweiligen Zellpellets verwendet.

Bei der Verwendung des Zellpellets des CAR aus *Mycobacterium marinum* und PPT aus *Bacillus subtilis* exprimierenden *E. coli*-Stammes konnte eine Bildung von geringen Mengen an 12-MTol nachgewiesen werden. Bereits nach einer Stunde war 12-MTol detektierbar und der Gehalt nahm nach 3 h bis 3% zu. Nach diesem Zeitpunkt war es nur noch in Spuren nachweisbar. Nach einer Stunde war bereits 12-MTol detektierbar. Der Umsatz stieg auf maximal 20% nach 6 h an.

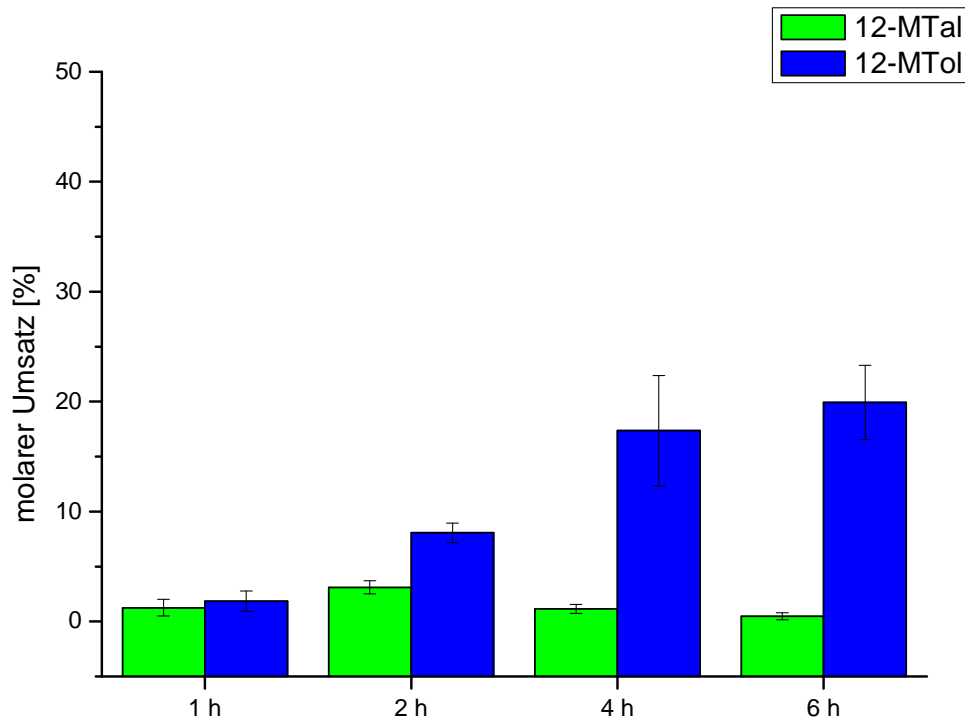


Abbildung 35: Kinetik der Ganzzellkatalyse des CAR, aus *Mycobacterium Marinum*, und PPT-exprimierenden Stammes

Wurde die CAR ohne aktivierende PPT exprimiert, so war ein ähnlicher Trend wie in Abbildung 35 erkennbar, jedoch waren die Ausbeuten an 12-MTol mit 6% nach 6 h und an 12-MTal wesentlich geringer.

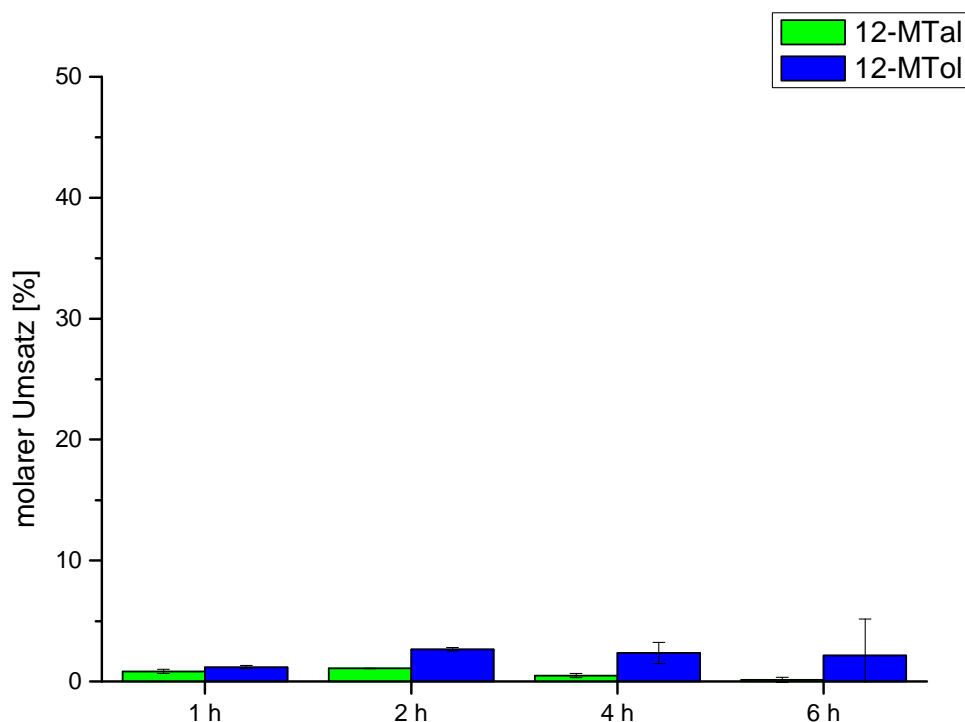


Abbildung 36: Kinetik der Ganzzellkatalyse des CAR aus *Mycobacterium marinum* exprimierenden Stammes

Bei Verwendung der Zellen, welche die CAR aus *Nocardia spec.* exprimieren, war der Trend vergleichbar mit den beiden zuvor beschriebenen Stämmen. Die Produktausbeute an 12-MTol stieg hier bis auf 13% nach 6 h an. 12-MTal konnte hier nur in Spuren detektiert werden.

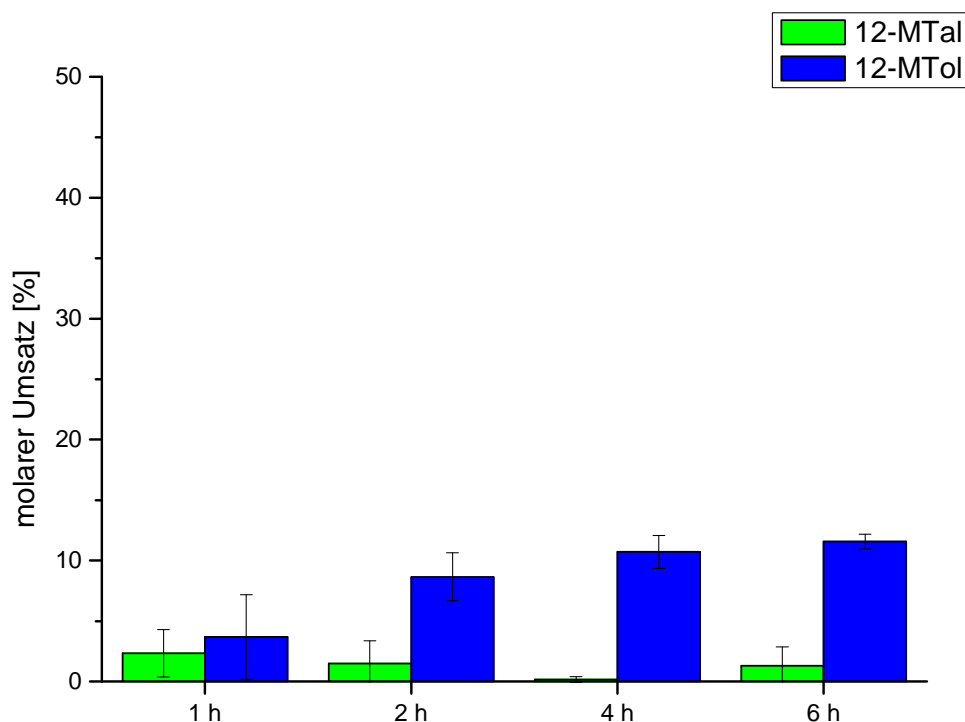


Abbildung 37: Kinetik der Ganzzellkatalyse des CAR aus *Nocardia* sp. exprimierenden Stammes

2.17.2 Blindwerte der Ganzzellkatalyse

Die Blindproben (2.11.5.1) – mit Hitze behandeltes Zellpellet – zeigten hingegen keine Umsetzung.

2.17.3 Blindwerte der Ganzzellkatalyse des *E. coli*-Stammes mit pET-28a

Die Umsetzung von 12-MTS mit *E. coli*-Zellen, in welche der Leervektor pET28a(+) transformiert wurde, zeigte weder Bildung des Aldehyden, noch des Alkohols.

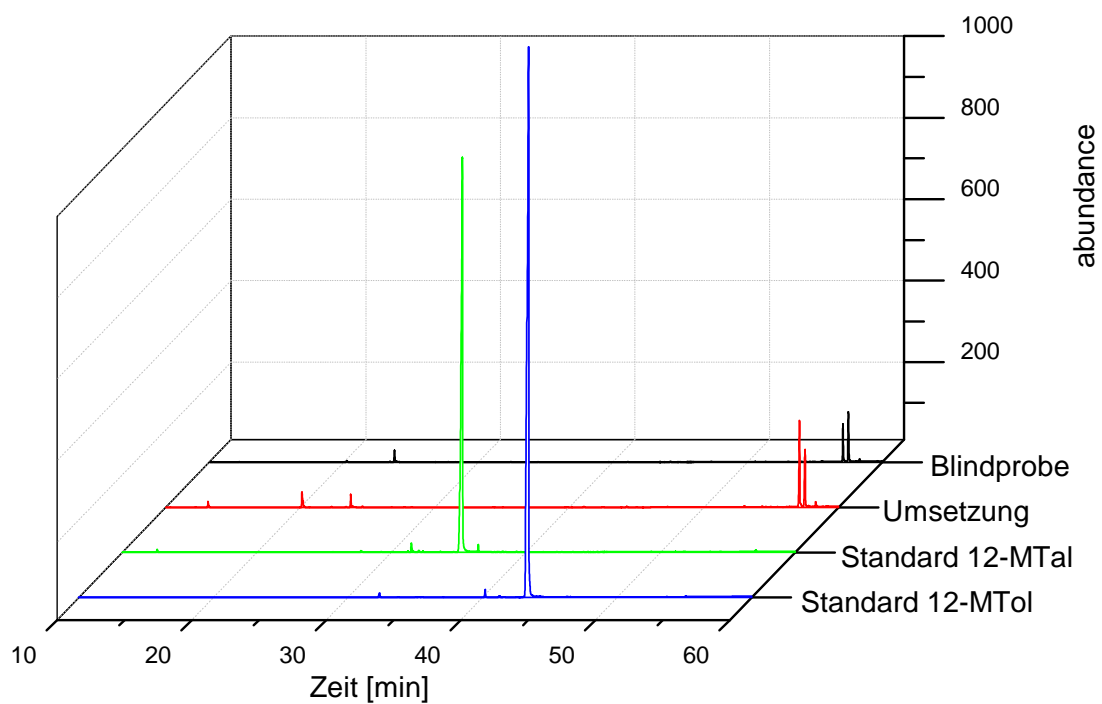


Abbildung 38: Umsetzung von 12-MTS mit Zellpellets des Stammes BL21DE3 mit Leervektor pET28a(+); für Parameter siehe Tabelle 31

Mit 12-MTal als Substrat hingegen konnte eine Bildung von 12-MTol beobachtet werden.

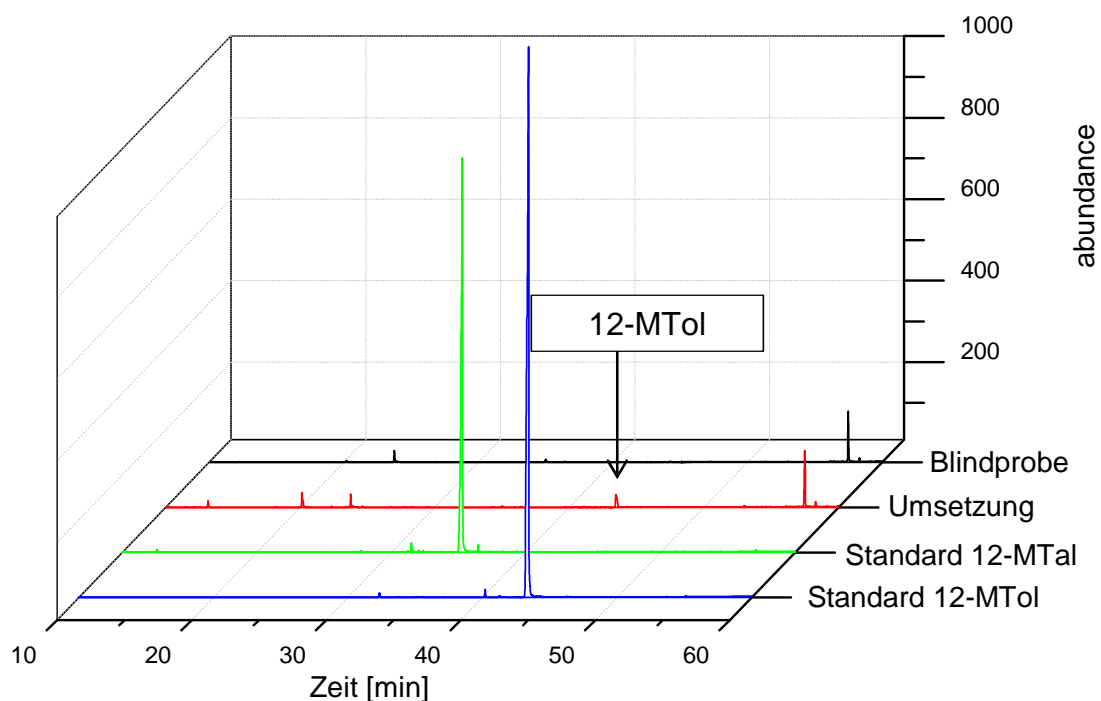


Abbildung 39: Umsetzung von 12-MTol mit Zellpellets des Stammes BL21DE3 mit Leervektor pET28a(+); für Parameter siehe Tabelle 31

2.18 Umsetzung mit isoliertem Enzym

2.18.1 Bilanzierung der Umsetzung mittels isolierter CAR

Bei der Umsetzung von 12-MTS zu 12-MTol mittels in *E. coli* co-exprimierter CAR aus *Mycobacterium marinum* mit aktivierender PPT aus *Bacillus subtilis* konnte der Aldehyd generiert werden. Hierbei wurde im Ansatz mit einer Konzentration von $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ der CAR (nach 2.11.2.5) eine Ausbeute von $26,21 \pm 15,18\%$ an 12-MTol erreicht. 12-MTol war nur in Spuren detektierbar, ebenso wurde das Substrat nur in Spuren wiedergefunden.

Mit einer Konzentration von $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ der CAR wurden $23,04 \pm 5,37\%$ 12-MTol generiert, wobei der korrespondierende Alkohol zu $4,34 \pm 0,80\%$ nachgewiesen wurde. Die Säure war auch hier nur noch in Spuren vorhanden.

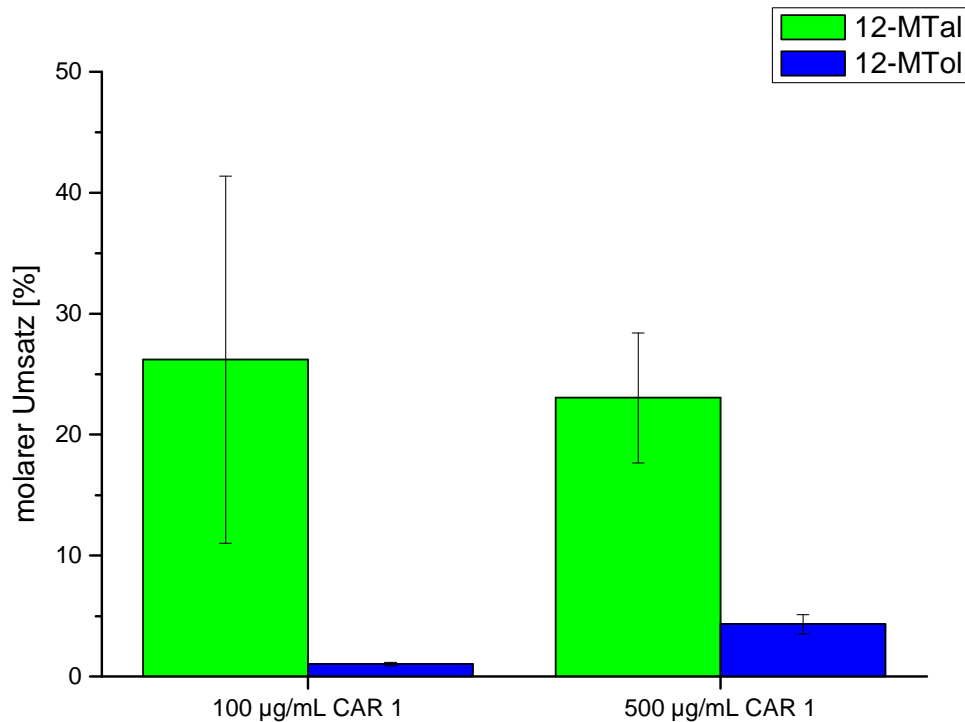


Abbildung 40: Umsetzung von 12-MTS mittels isolierter CAR(1) aus *Mycobacterium marinum*, aktiviert durch PPT;
 links: Umsetzung durch 100 µg mL⁻¹ der CAR(1);
 rechts: Umsetzung durch 500 µg mL⁻¹ der CAR(1)

Die Umsetzung von 12-Methyltridecansäure zu 12-Methyltridecanal mittels in *E. coli* exprimierter CAR(2) (aus *Mycobacterium marinum* ohne die aktivierende PPT) verlief erfolgreich, jedoch nur im Ansatz mit einer Konzentration des Enzyms von 500 µg mL⁻¹. Die Ausbeute an 12-MTol betrug 4,48 ± 2,71%. 12-Methyltridecanol konnte nicht identifiziert werden.

Bei Verwendung einer geringeren Konzentration der CAR(2) (100 µg mL⁻¹) zeigte sich keine Bildung des gewünschten Zielproduktes.

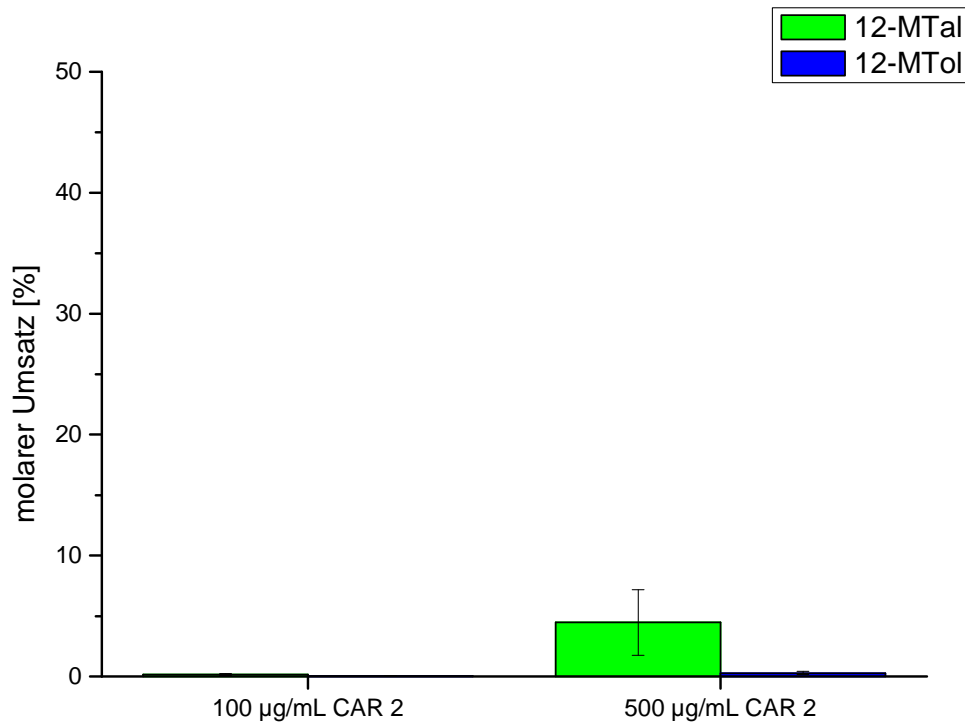


Abbildung 41: Umsetzung von 12-MTS mittels isolierter CAR(2) aus *Mycobacterium marinum*;

links: Umsetzung durch 100 µg mL⁻¹ der CAR(2);

rechts: Umsetzung durch 500 µg mL⁻¹ der CAR(2)

Die Verwendung der CAR(3) aus *Nocardia spec.* in einer Konzentration von 100 µg mL⁻¹ zeigte in Spuren die Umsetzung zu 12-MTol, wobei das Substrat noch zu 38,28 ± 26,74 % vorlag.

Durch eine Erhöhung der Enzymkonzentration auf 500 µg mL⁻¹ konnte die Ausbeute an 12-MTol auf 5,24 ± 2,80 % gesteigert werden. Das Substrat war zu 5,42 ± 3,15 % noch im Ansatz nachweisbar.

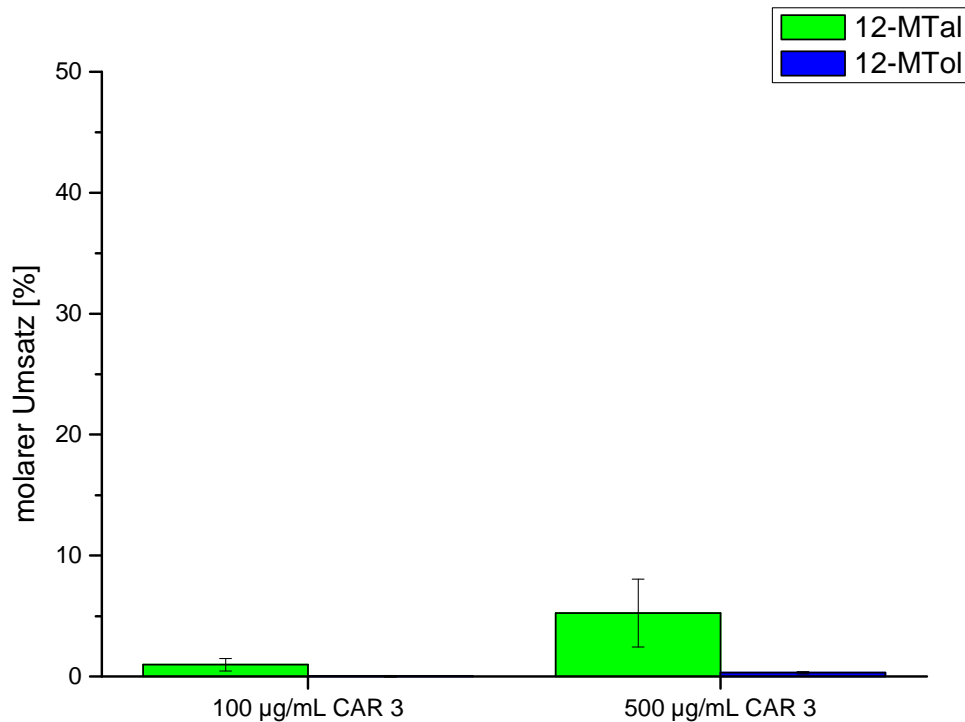


Abbildung 42: Umsetzung von 12-MTS mittels isolierter CAR(3) aus *Nocardia* sp.;

links: Umsetzung durch 100 µg mL⁻¹ der CAR(3);

rechts: Umsetzung durch 500 µg mL⁻¹ der CAR(3)

2.18.2 Blindwerte der Umsetzung mittels isolierter CAR

Die Blindproben (2.11.5.1) - sowohl mit Hitze-inaktiviertem Protein als auch ohne Proteinzusatz (vgl. Blindwerte der Umsetzung mittels isolierter CAR) - zeigten keine Umsetzung.

Die Wiederfindungsrate an 12-MTS in einem Ansatz ohne Enzym betrug $77,88 \pm 2,31$ % (vgl. Abbildung 43).

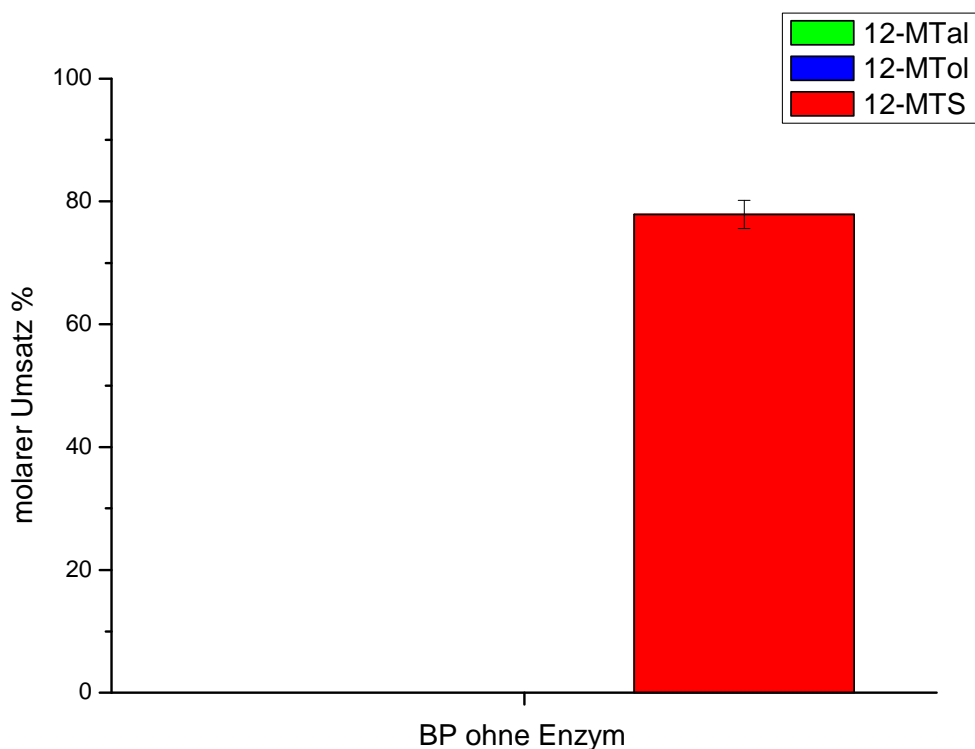


Abbildung 43: Blindprobe auf Biotransformation durch den Puffer mit Co-Faktoren

2.18.3 Kinetik der Umsetzung mittels isolierter CAR

Die Wahl der Konzentration der einzelnen Enzyme für eine Kinetik fiel auf $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, da sowohl die höchste Ausbeute als auch der höchste Umsatz durch CAR(1) aus *Mycobacterium marinum* (welche zuvor mittels PPT aktiviert wurde, vgl. 2.18.1) mit einer Konzentration von $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ erreicht wurden.

Mit $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ von CAR(1) konnte bereits nach 2 h Produkt ($22,11 \pm 0,53$ % an 12-MTol) quantifiziert werden. Die Menge an 12-MTol erreichte während der 6 h $22,55 \pm 7,03$ %. Während des Umsetzungszeitraumes konnte 12-MTol nur in Spuren detektiert werden.

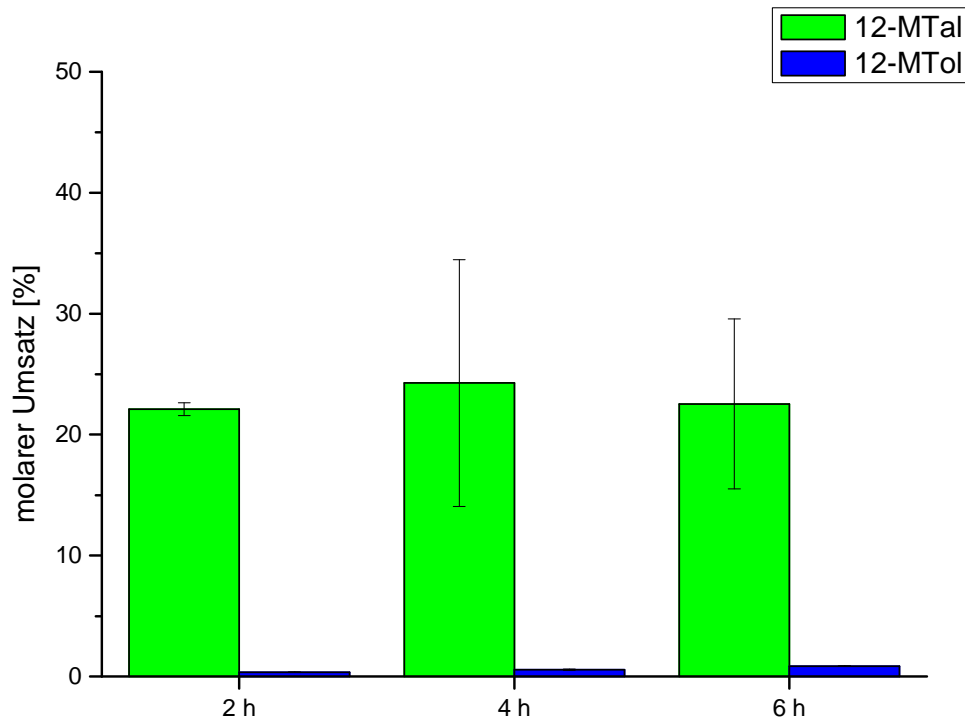


Abbildung 44: Zeitlicher Verlauf der Umsetzung von 12-MTS durch isolierte CAR (CAR1), stammend aus *Mycobacterium marinum*, welche zuvor mittels PPT aktiviert wurde

CAR(2), ebenso aus *Mycobacterium marinum*, welche jedoch nicht durch eine PPT aktiviert wurde, zeigte geringere Ausbeuten und Umsätze als die aktivierte CAR(1). Eine Produktbildung war ebenso nach 2 h sichtbar, es konnten $8,51 \pm 3,56$ % an 12-MTol im Ansatz gefunden werden. Nach 6 h wurde die Menge an Zielprodukt nicht mehr gesteigert und stagnierte bei $7,10 \pm 0,48$ %.

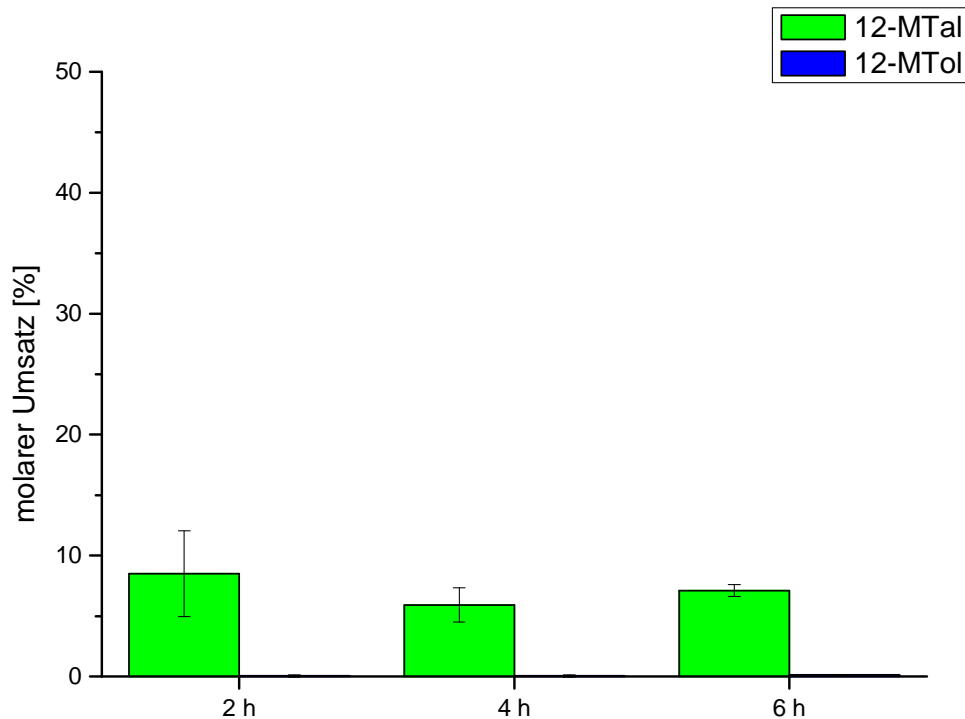


Abbildung 45: Zeitlicher Verlauf der Umsetzung von 12-MTS durch isolierte CAR (CAR2), stammend aus *Mycobacterium marinum*

Die dritte CAR, welche zur Verfügung stand, CAR(3) aus *Nocardia* sp., war auch in der Lage signifikante Mengen an 12-MTol zu generieren. Nach 2 h konnten hier bereits $19,43 \pm 1,64$ % an 12-MTol gemessen werden, wobei die Ausbeute nicht weiter stieg und nach 6 h auch hier stagnierte, jedoch hier im Gegensatz zu der - ebenso nicht durch PPT aktivierten - CAR(2) bei $19,06 \pm 4,04$ %.

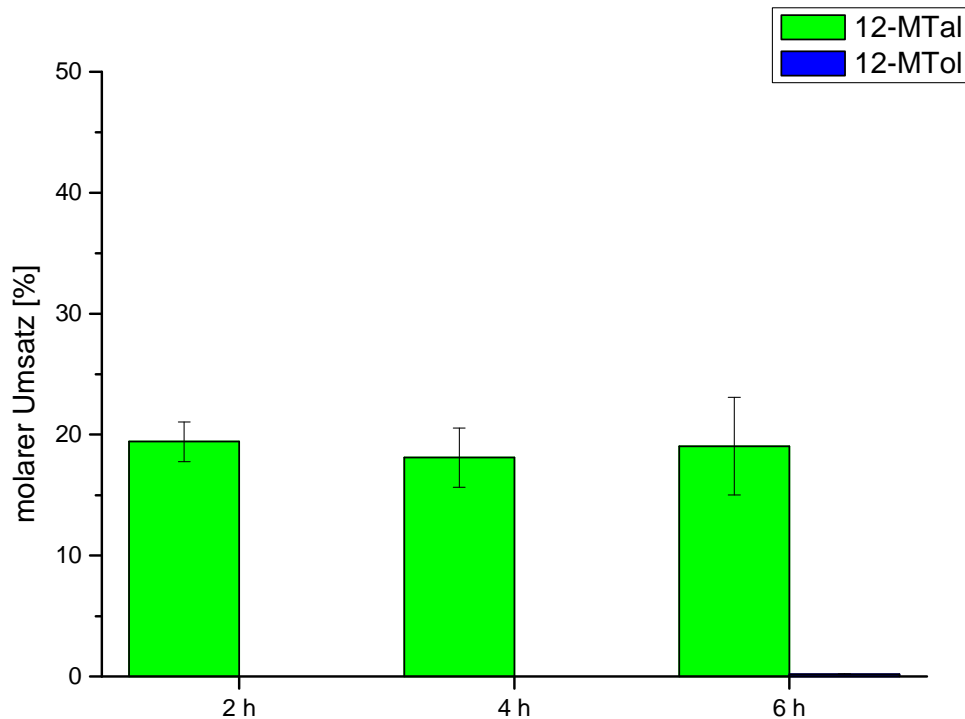


Abbildung 46: Zeitlicher Verlauf der Umsetzung von 12-MTS durch isolierte CAR (CAR3), stammend aus *Nocardia* sp.

2.18.4 Bestimmung der Aktivität der CAR mittels NADPH-Assay

Die Enzymaktivitäten der einzelnen CARs konnten durch den Assay auf NADPH (vgl. 2.11.7) bestimmt werden. Es zeigte sich hierbei, dass die CAR aus *Mycobacterium marinum*, welche vor der Isolierung nach 2.8.3 durch die Phosphopantetheinyltransferase (PPT) aus *Bacillus subtilis* aktiviert wurde, die höchste Aktivität mit $3,1300 \mu\text{mol} (\text{min L})^{-1}$ besaß, während die CAR aus dem gleichen Mikroorganismus stammend – ohne vorherige Aktivierung durch eine PPT – eine Aktivität von $0,0180 \mu\text{mol} (\text{min L})^{-1}$ zeigte. Die Aktivität der CAR aus *Nocardia spec.* wurde zu $0,6700 \mu\text{mol} (\text{min L})^{-1}$ bestimmt.

2.19 Experimente mit Lipidextrakt aus CHET-N

2.20 Untersuchung der Aktivität und der Spezifität der Lipase aus *Candida rugosa*

Aus den Assays nach 2.11.8 wurde ersichtlich, dass die Lipase die höchste Aktivität bei der Freisetzung von Octansäure (Caprylsäure) aufweist.

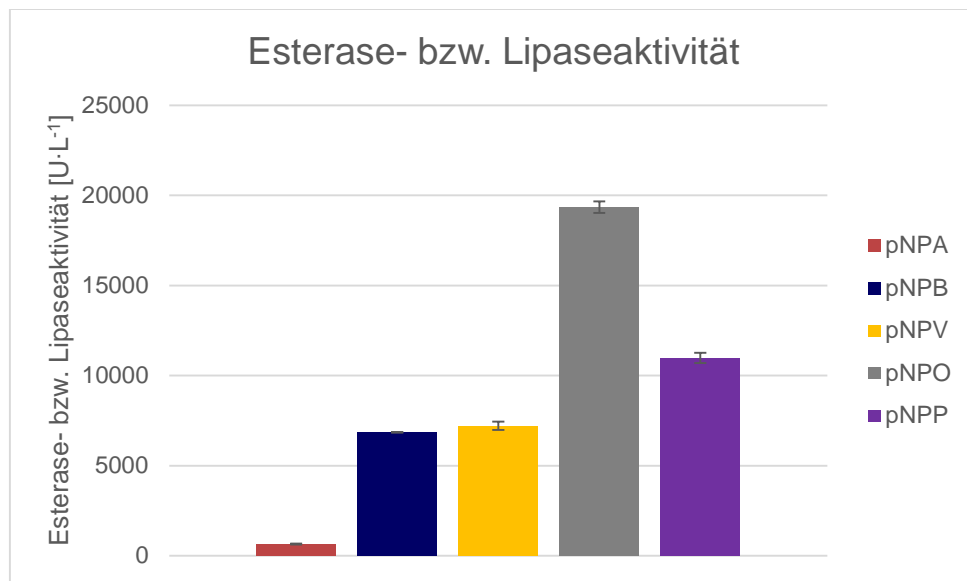


Abbildung 47: Diagramm der Messergebnisse der Assays nach Winkler und Stuckmann (1979) als auch Purdy und Kolattukudy (1973)

2.20.1 Isolierung der Lipide

Bei einer Biotrockenmasse des Myzels von $18,31 \text{ g L}^{-1}$ wurde eine Lipidausbeute von $3,22 \text{ g L}^{-1}$ erreicht.

2.20.2 Bestimmung der Fettsäuremethylesterverteilung (FSME) des Lipidextraktes von CHET-N

Der Pilz CHET-N ist literaturbekannt für seine Produktion an methylverzweigten Fettsäuren, unter anderem 12-MTS (Tyrell 1968) (Tyrell 1971) (Tyrell und Weatherstone 1976). Somit fiel die Wahl auf diesen Pilz, um Edukt für die Herstellung von natürlichem 12-MTal zu gewinnen.

Nach basischer Hydrolyse und anschließender Veresterung des Lipidextrakts (vgl. 2.11.9.6) wurden verschiedene verzweigte Fettsäuren (als Methylester) identifiziert. 14-Methylhexadecansäure konnte mit 0,8%, 14-Methylpentadecansäure mit 6,9% und 12-Methyltetradecansäure mit 11,3% in dem Extrakt nachgewiesen werden. Als Hauptkomponente der Fettsäureproduktion des Pilzes CHET-N konnte 12-Methyltridecansäure gaschromatographisch identifiziert werden, welche mit 29,5% vertreten war.

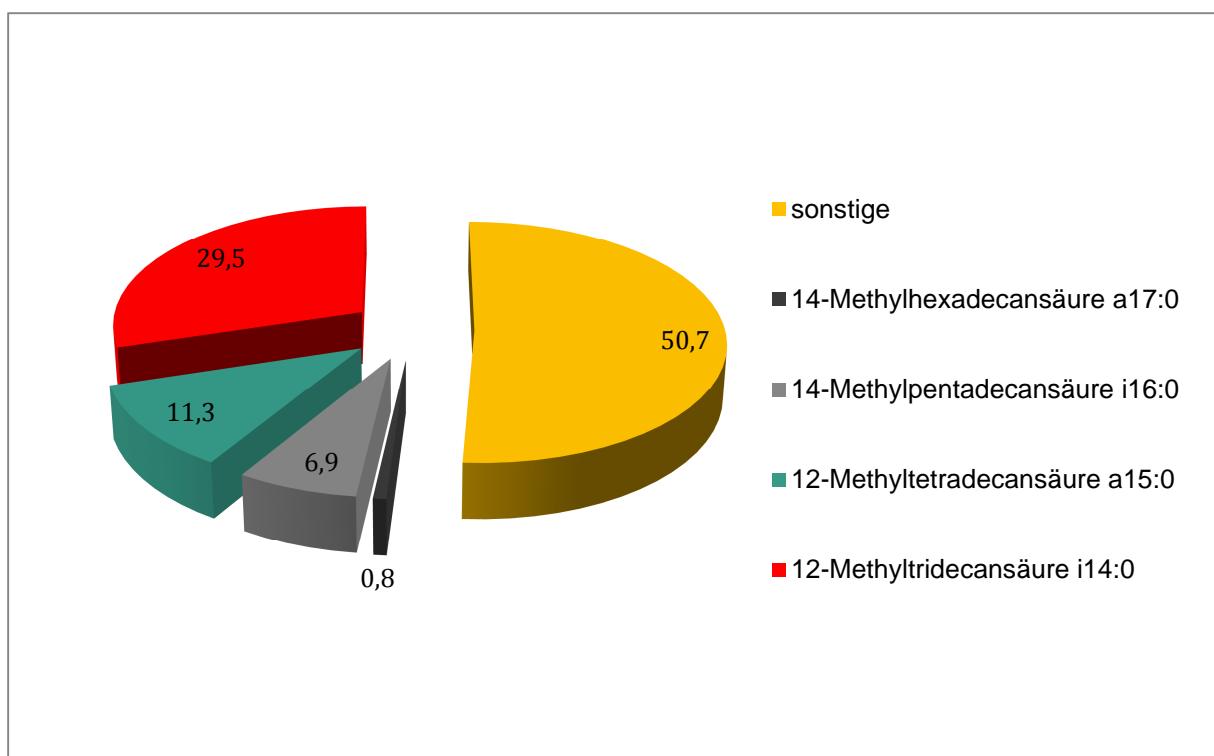


Abbildung 48: Fettsäuren des Lipidextraktes von CHET-N

Des Weiteren fanden sich sowohl verschiedene weitere gesättigte als auch ungesättigte Fettsäuren in dem Extrakt (Tabelle 40).

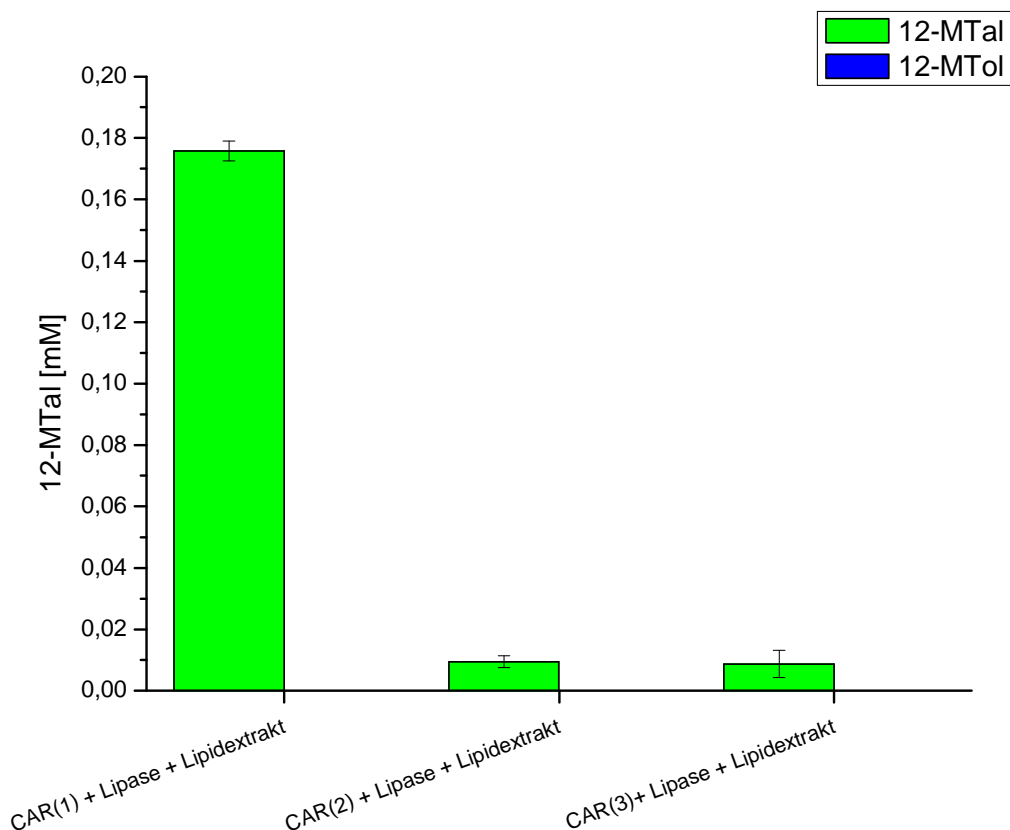
Tabelle 40: Auftreten der Nebenkompenten des Lipidextraktes von CHET-N

Fettsäure	Abkürzung	Prozent [%]
Dodecansäure	12:0	0,3
Tridecansäure	13:0	1,4
Tetradecansäure	14:0	7,8
Pentadecansäure	15:0	4,7
Hexadecansäure	16:0	8,3

2.20.3 Umsetzung des Lipidextraktes aus CHET-N mittels isolierter CAR

Da die einzelnen Enzyme jeweils nach 2 h bereits die maximale Ausbeute an 12-MTol erreichten (vgl. 2.18.3), wurde für die Umsetzung des Lipidextraktes der Zeitraum von 2 h für die Inkubation beibehalten.

Mit CAR(1) konnte eine Ausbeute von $0,175 \pm 0,003$ mM erreicht werden. Die anderen beiden CARs erreichten diese Ausbeute nicht. Der Ansatz mit der CAR(2)-Lösung erzielte $0,009 \pm 0,001$ mM und CAR(3) erreichte $0,008 \pm 0,004$ mM an 12-MTol. In allen drei Ansätzen konnte kein 12-MTol identifiziert werden.



**Abbildung 49: Umsetzung des Lipidextraktes, isoliert aus CHHET-N,
mittels Lipase und der CARs nach 2 h**

Nach der Umsetzung des Lipidextraktes durch Lipase und CAR(1) konnten in dem Chromatogramm noch weitere Substanzen identifiziert werden, welche durch Biotransformation entstanden sind. Neben der gewünschten Zielsubstanz wurden Dodecanal, Tridecanal, Tetradeccanal, Pentadeccanal und Hexadeccanal durch Abgleich der Massenspektren und der Retentionsindices zugeordnet (Abbildung 50). Mit 12-Methyltetradeccanal wurde ein weiterer methylverzweigter Aldehyd durch Biotransformation gebildet.

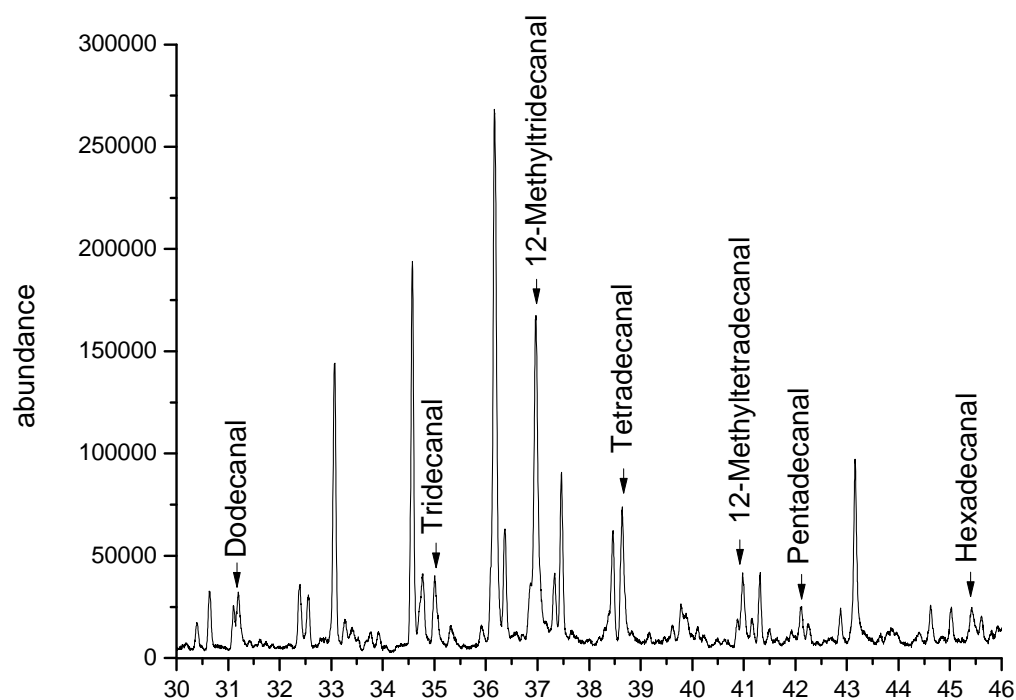


Abbildung 50: Ausschnitt des Chromatogramms der Umsetzung des Lipidextraktes, isoliert aus CHET-N, mit Lipase und CAR(1) nach einer Inkubationszeit von 2 h; für Parameter siehe Tabelle 33

Enzymatische Umsetzung des Lipidextraktes von CHET-N mit isolierter CAR Tabelle 41: Retentionsindizes der identifizierten Verbindungen

Substanz	Retentionsindex DB-5MS		Retentionsindex VF-WAXms	
	Probe	Standard / Literatur	Probe	Standard / Literatur
Dodecanal	1411	1409	1708	1718
Tridecanal	1512	1514	1943	1910-1930
12-Methyltridecanal	1620	1620	1872	1874
12-Methyltetradeccanal	1686	1688	1920	n.v.
Pentadecanal	1716	1718	1991	1999
Hexadecanal	n.v.	1819	2147	2143

2.20.4 Blindwerte der Umsetzung des Lipidextraktes

Der Blindwert mit hitze-inaktivierter CAR zeigte keine Reduktion zu Aldehyden. Der Ansatz ohne Zusatz von Lipase zeigte hingegen ebenfalls die Bildung von Aldehyden. Das beobachtete Produktspektrum entsprach dem der Umsetzung unter Beteiligung der Lipase.

2.20.5 Bestimmung der frei vorliegenden Fettsäuren

Bei der Extraktion nach 2.11.9.8 konnte gezeigt werden, dass 12-MTS im verwendeten Phosphatpuffer (50 mM, pH = 7,5) bereits frei vorliegt (vgl. Abbildung 53). Somit lässt sich das Auftreten von 12-MTal bei der Umsetzung des Lipidextraktes trotz nicht vorhandener Lipase erklären. Abbildung 51 zeigt 100 mg mL^{-1} des Methylesters von 12-MTS, welches analog 2.11.9.6 behandelt wurde.

Der Lipidextrakt wurde zu Beginn mit Phosphatpuffer versetzt, um die Bedingungen zu schaffen, welche analog der Biotransformation sind. Anschließend wurde nach Extraktion der Triacylglyceride (TAG) im organischen Lösungsmittel die wässrige Phase angesäuert – um die freien Säuren unpolarer zu machen. Im nächsten Schritt wurde der wässrige Extrakt mit organischem Lösungsmittel versetzt, um die langkettigen Säuren zurück zu extrahieren. Dieser Schritt war notwendig, um die für die Umesterung notwendige Lewis-Säure BF_3 nicht mit Wasser des wässrigen Puffers zu hydrolysieren.

Die TAG wurden mittels Verseifung freigesetzt und anschließend verestert (analog 2.11.9.6.).

In beiden Fraktionen konnte 12-MTS (als Methylester) identifiziert werden. 12-MTS liegt sowohl ungebunden als auch gebunden im Lipidextrakt von CHET-N vor.

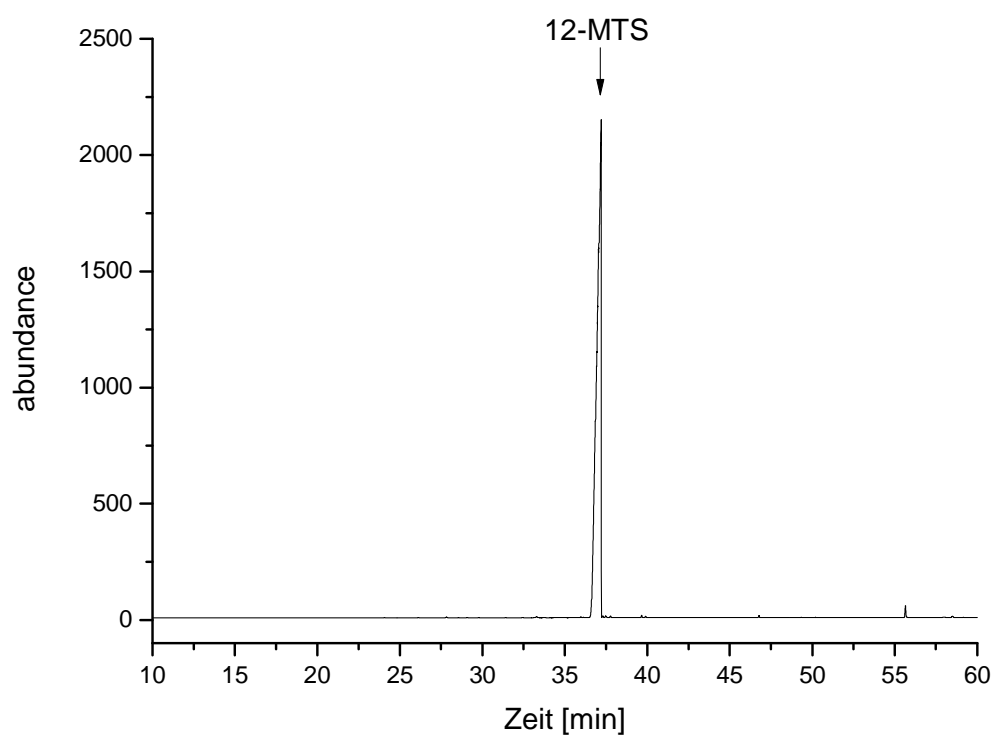


Abbildung 51: Chromatogramm der Substanz 12-MTS-, hier als Methylester analysiert, 100 mg mL⁻¹; für Parameter siehe Tabelle 31

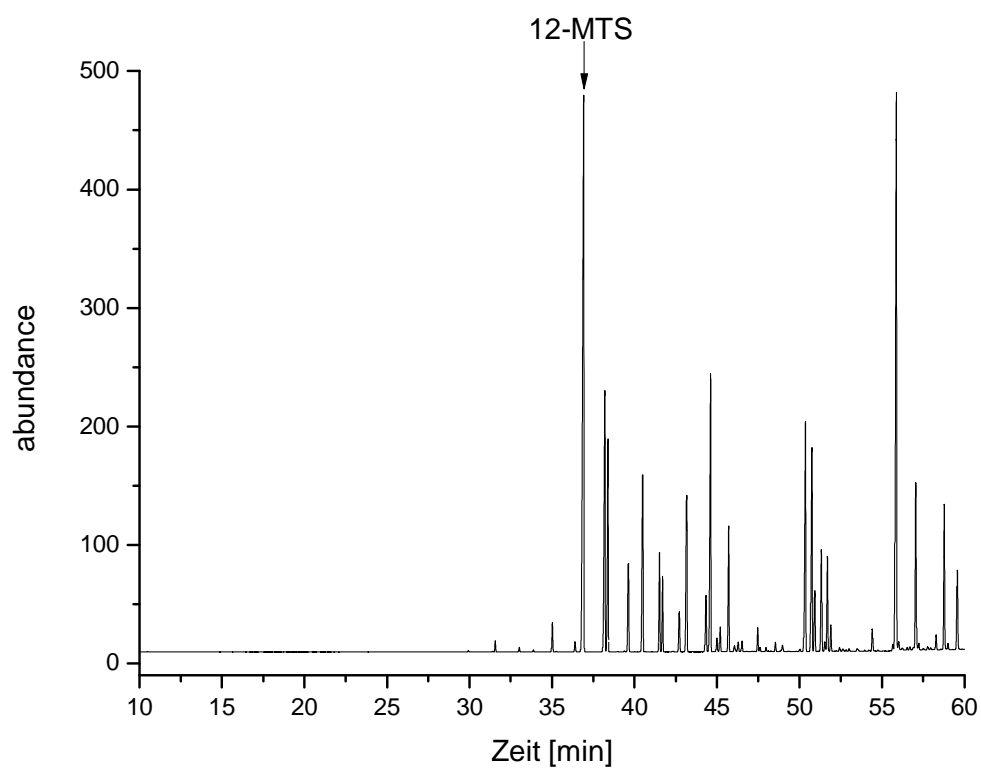


Abbildung 52: Chromatogramm des organischen Extraktes des Lipidextraktes von CHET-N; Säure jeweils als Methylester; für Parameter siehe Tabelle 31

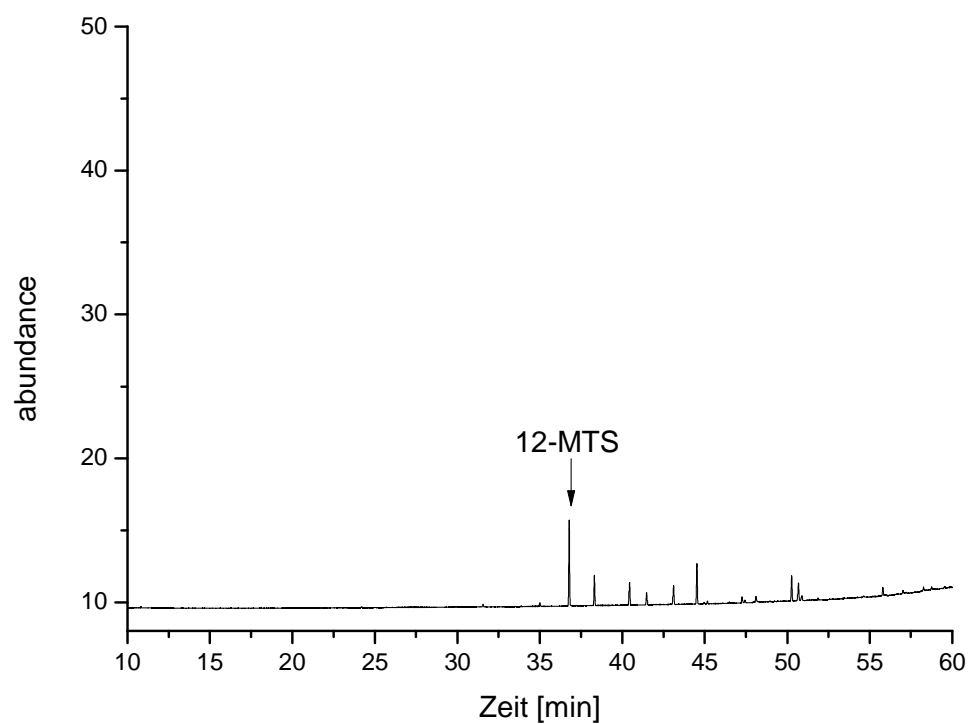


Abbildung 53: Chromatogramm des wässrigen Extraktes des Lipidextraktes von CHET-N; Säure jeweils als Methylester; für Parameter siehe Tabelle 31

Diskussion

Am Beispiel des am häufigsten verwendeten Aromas, Vanillin, zeigt sich die hohe Nachfrage der Gesellschaft nach natürlichen Aromen. Für natürliches Vanille-Aroma, gewonnen aus biotechnologischen Verfahren, wird deswegen der 50-100 fache Preis des synthetisch produzierten Aromas bezahlt (Deutscher Verband der Aromenindustrie e. V. 2016). Sensorisch lässt sich kein Unterschied zwischen den unterschiedlich hergestellten Aromastoffen feststellen. Mittels spezieller Analysenmethoden können jedoch Rückschlüsse auf die Herstellung der Aromen gezogen werden (Arbeitsgruppe "Aromastoffe" und "Stabilisotopenanalytik" in der Lebensmittelchemischen Gesellschaft 2010). Bei einem Jahresbedarf von 15.000 Tonnen pro Jahr reicht die Produktion an Vanille-Aroma durch Extraktion und Isolierung aus Vanilleschoten bei Weitem nicht aus (Deutscher Verband der Aromenindustrie e. V. 2016). Ein ähnliches Problem stellt sich bei der Produktion von natürlichem Fleischaroma: Es ist bisher keine Möglichkeit bekannt, um die Hauptaromakomponente von gekochtem Rindfleisch biotechnologisch herzustellen.

Große Aufmerksamkeit erlangte die Substanz 3,4-(Methylenedioxy)benzaldehyd (Piperonal), welche sowohl nach Vanille als auch nach Mandeln riecht. Piperonal ist einer von 2.500 in Europa gelisteten Aromastoffen, welcher in der Zubereitung der Schokoladensorte „Vollnuss“ der Firma Ritter Sport Verwendung fand (Transkript 2014). Im Jahr 2013 bewertete die Stiftung Warentest diese Schokoladensorte als „mangelhaft“. Laut Stiftung Warentest wurde chemisch synthetisiertes Piperonal anstelle des als natürlich deklarierten Aromas in der Schokolade nachgewiesen, und das Erzeugnis gelte somit als nicht verkehrsfähig (Stiftung Warentest 2013). Das Oberlandesgericht München wies diesen Vorwurf am 9. September 2014 zurück, da ein Beleg der Stiftung Warentest nicht erbracht wurde (Ritter Sport 2014) (Süddeutsche Zeitung 2014) (Spiegel Online 2014) (taz Online 2014). Seitens der Symrise AG wurden verschiedene Verfahren vorgelegt, mit welchen es möglich sei, Piperonal biotechnologisch herzustellen (Ritter Sport 2014) (Transkript 2014). Dies sei unter anderem möglich, indem eine Vorstufe des Piperonals, Safrol, aus dem Sassafrasbaum isoliert werde. Safrol kommt zu 80% im Öl des Sassafrasbaumes vor, welcher hauptsächlich in Nordamerika wächst.

Safrol könne mittels biotechnologischer Oxidation zum Piperonal umgesetzt werden. Problematisch bei der Handhabung und der Gewinnung sei dabei die

betäubungsmittelrechtliche Bewilligung, da aus Safrol auch „Ecstasy“ hergestellt werden könne - so Prof. Reinhold Carle der Universität Hohenheim (Leihensender 2014). Diese Auseinandersetzung der Stiftung Warentest, der Firmen Ritter Sport und der Symrise AG zeigt sowohl die Brisanz der Thematik „natürliches Aroma“ als auch das Verlangen der Gesellschaft nach natürlichen Lebensmittelzutaten.

Ziel dieser Arbeit war es, ein biotechnologisches Verfahren zur Herstellung eines natürlichen Fleischaromastoffs zu entwickeln. Das Molekül 12-MTal ist eine Schlüsselaromakomponente von gekochtem Fleisch (Guth und Grosch 1993). In der Zukunft soll es eine entscheidende Rolle in der Standardisierung von Fleischprodukten und in der Erzeugung von neuen fleischlosen Nahrungsmitteln als Alternative zu Fleisch spielen.

Die Substitution von tierischen Nahrungsmitteln ist ökologisch ratsam: Um 1 kg Fleisch zu produzieren, sind 2 - 15 kg Pflanzen notwendig (Aiking, de Boer und Vereijken 2011). Zwischen 1980 und 2007 stieg die globale Fleischproduktion von 137 auf 286 Millionen Tonnen und die von Milch von 465 auf 671 Millionen Tonnen an (FAO 2009 b). Laut Daten von Statista.com lag die weltweite Produktion an Fleisch 2014 bereits bei 315,4 Mio t Schlachtgewicht (vgl. Abbildung 54) (statista.com 2014). Einer Schätzung von Steinfeld *et al.* zu folge könnte es aufgrund der steigenden Weltbevölkerung im Jahr 2050 zu einer Produktion von 465 Millionen Tonnen Fleisch und 1043 Millionen Tonnen Milch kommen (Steinfeld und Gerber 2006). Um die Umweltbelastung zu mindern (McMichael, *et al.* 2007), ist es notwendig, neue Wege in der Ernährung zu eröffnen, und den Bedarf an Protein zu decken. Bisher wurden verschiedene Alternativen für Fleisch erforscht (Fellet 2015). Meist wird der Fleischersatz aus Soja hergestellt (Fukushima 1994, 2004). Andere Ansätze behandelten den Ersatz von Fleisch durch Fisch (Brooker 1985) (Fiddler *et al.* 1991 b, 1993 a, 1993 b) oder durch Pilze (Edelman 1983) (Denny 2008) (Rodger 2001). Ein Vorteil der Substitution von Fleisch durch Pilz ist die damit einhergehende Senkung des Cholesterolspiegels (Huang, *et al.* 2016) (Caz, *et al.* 2015) (Turnbull, Leeds und Edwards 1992) (Turnbull, Walton und Leeds 1993) und eine insgesamt gesündere Ernährung (Wheelock 1993).

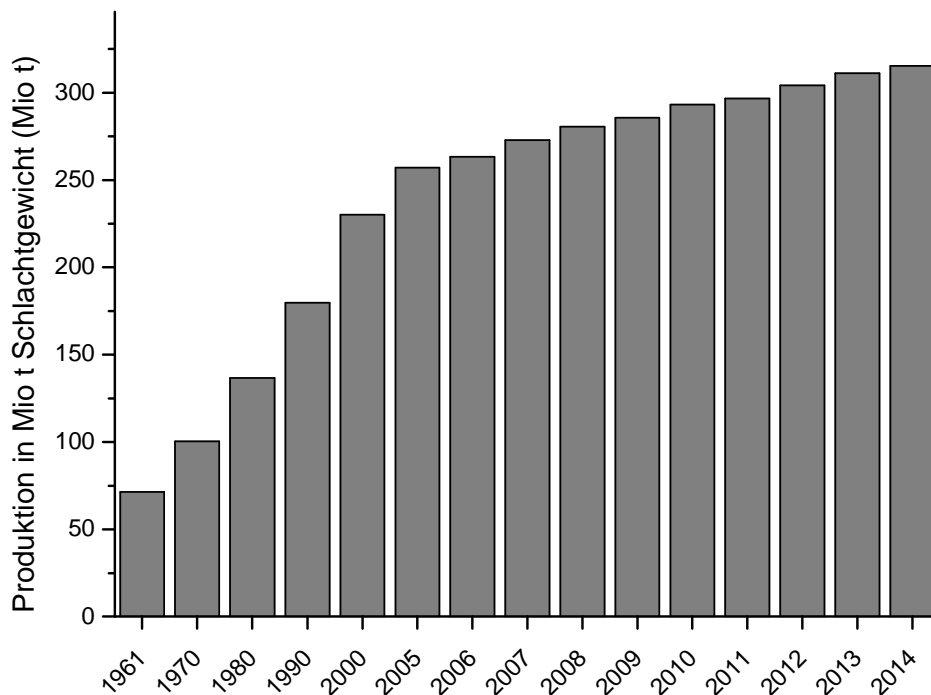


Abbildung 54: weltweite Fleischproduktion von 1961 bis 2014 (statista.com 2014)

12-Methyltridecanal soll eingesetzt werden, um die sensorischen Eigenschaften von gekochtem Fleisch zu erzeugen. Die jeweiligen Lebensmittel würden somit für den Verbraucher geschmacklich attraktiver.

Um eine biotechnologische Herstellung des Aldehyds zu gewährleisten, war eine geeignete Vorstufe erforderlich, welche auf natürlichem Wege hergestellt werden muss. Geeignete Vorstufen sind methylverzweigte Fettsäuren, welche durch enzymatische Reduktion zu 12-MTal umgesetzt werden. Fettsäuren kommen in nahezu allen lebenden Organismen als Bestandteil von Lipiden vor (eine Ausnahme stellen hier die halophilen Bakterien dar, welche keine Fettsäureester, sondern hauptsächlich Ether-Bindungen aufweisen (Sehgal, Kates und Gibbons 1962) (Rezanka und Sigler 2009). Meist handelt es sich um nicht verzweigte, gesättigte oder ungesättigte Fettsäuren, welche typischerweise 12 bis 20 Kohlenstoffatome aufweisen. Fettsäuren mit weniger als 12 Kohlenstoffatomen oder mehr als 22 Kohlenstoffatomen sind eher selten anzutreffen (Rezanka und Sigler 2009). Jedoch wurden auch solche mit mehr als 20 Kohlenstoffatomen gefunden, so zum Beispiel in

Mikroorganismen (Rezanka, Cudlin und Podojil 1987), Insekten (Buckner 1993), verschiedenen Pflanzen (Kolattukudy 1976) (Hamilton 1995) und Tieren (Rezanka 1989) (Poulos 1995).

Zunächst musste eine Quelle gefunden werden, in welcher methylverzweigte Fettsäuren in ausreichendem Maße vorhanden sind.

In den meisten Pflanzen kommen methylverzweigte Fettsäuren lediglich in Spuren vor (Diedrich und Henschel 1990), jedoch wurden sie in Milch nachgewiesen (Vlaemenick, et al. 2006). Von Vlaemenick *et al.* wurde postuliert, dass die gesuchten Fettsäuren durch Pansenbakterien produziert werden. Von Asselineau und Lederer wurde das Vorkommen von verschiedenen methylverzweigten Fettsäuren in *Mycobacterium tuberculosis* beschrieben (Asselineau und Lederer 1960). Im selben Jahr wurden die endständig methylverzweigten Fettsäuren 13-Methyltetradecansäure ($i15:0$) und 15-Methylhexadecansäure ($i17:0$) von Saito in *Bacillus subtilis* (*natto*) nachgewiesen (Saito 1960). Von den weit über 300 bekannten Spezies der Gattung *Bacillus* (List of prokaryotic names 2017) (Buchanan und Gibbons 1974) wurden in 22 Spezies gesättigte *iso*- und *anteiso*-Fettsäuren als Hauptbestandteil des Lipidextraktes identifiziert.

Der Anteil an *iso*- und *anteiso*-Fettsäuren in den Lipidextrakten betrug 60-90% (Kaneda 1977). Die in *Bacillus*-Spezies gefundenen Fettsäureverteilungen setzten sich aus 12 bis 17 Kohlenstoffatomen langen *iso*- und *anteiso*-Fettsäuren zusammen (Kaneda 1967) (Kaneda 1968) (Kaneda 1969) (Weerkamp und Heinen 1972) (Yao, Walker und Lillard 1970) (Kaneda 1991) (vgl. Tabelle 42).

Tabelle 42: Ausgewählte Fettsäuren (i14:0, i15:0, i16:0 und i17:0)

aus verschiedenen *Bacillus*-Spezies (Kaneda 1977)

Spezies	Stamm	i14:0	i15:0	i16:0	i17:0
		[%]	[%]	[%]	[%]
<i>B. alvei</i>	B-32	2	15	8	15
	B-84	0	29	3	8
<i>B. brevis</i>	B-33	0	25	5	6
	B-34	3	28	9	3
<i>B. circulans</i>	B-28	7	26	8	7
	B-29	1	18	4	8
<i>B. licheniformis</i>	B-49	0	28	3	14
	B-50	0,3	27	4	14
<i>B. macerans</i>	B-41	1	30	5	13
	B-40	0,2	26	4	14
<i>B. megaterium</i>	B-15	5	16	2	0
	B-78	4	27	1	1
<i>B. polymyxa</i>	C-42-3	1	0,3	9	0
<i>B. pumilus</i>	B-12	2	18	5	7
	B-13	0,4	25	3	14
<i>B. subtilis</i>	B-4	4	14	11	15
	B-770	2	13	9	13
<i>B. larvae</i>	B-2605	0,8	7	8	7
	B-2610	2	5	3	2
<i>B. lentimorbus</i>	B-2522	-	6	0,6	20
	B-2519	-	2	1	50
<i>B. popilliae</i>	R-F.	2	5	3	2
	PHL	4	5	4	1
<i>B. cereus</i>	B-17	6	26	14	6
	B-19	3	23	12	9
	B-82	16	20	16	7
<i>B. thuringiensis</i>	W.S.	3	25	21	5
	B-2172	9	21	9	6
<i>B. acidocaldarius</i>	Agnano	0	1	6	15

Effektiver als die Verwendung der Bakterien wäre eine heterologe Expression von Fettsäuresynthasen, um höhere Gehalte an den jeweiligen Fettsäuren zu erhalten. Beispielsweise wurde das Auftreten von methylverzweigten Fettsäuren ebenso in *Blattella germanica* im Jahre 1992 von Juárez *et al.* beschrieben. Es handelt sich hierbei um eine Kakerlaken-Spezies, welche mikrosomale Fettsäuresynthasen besitzt und zum Beispiel i16:0 produzieren kann. Einige Peaks der Chromatogramme wurden allerdings nicht zugeordnet (Juárez, Chase und Blomquist 1992). Ob es sich hierbei möglicherweise um methylverzweigte Fettsäuren handelte wurde nicht

untersucht. Die Synthese von *iso*-Fettsäuren kann durch die Zugabe von verschiedenen Substanzen gesteigert werden. So wurde beispielsweise die Synthese von geradzahligen Fettsäuren (*i*14:0 und *i*16:0) bei der Zugabe von L-Valin zu Kulturen von *B. subtilis* um 14% gesteigert. L-Leucin steigerte die Produktion von ungeradzahligen Fettsäuren (*i*15:0 und *i*17:0) im selben Organismus um 21% (Kaneda 1977). Ähnliche Ergebnisse wurden bei einer anderen, nicht identifizierten *Bacillus*-Spezies beobachtet (Daron 1973).

Problematisch hierbei gestaltet sich allerdings die Versorgung mit möglichem Edukt für die Produktion von 12-MTal mit dem Bakterium, da die Synthese der methylverzweigten Fettsäuren in *B. subtilis* über verschiedene kurzkettige methylverzweigte Fettsäuren führt, welche in diesem Fall als Inhibitor für das Wachstum fungieren (Willecke und Pardee 1971). Das Hauptaugenmerk wurde somit auf Pilze gelegt, um den Aspekt der Aufbereitung nach herkömmlichen Lebensmittelzubereitungsverfahren für den menschlichen Verzehr, gemäß Verordnung (EG) Nr. 1334/2008, zu wahren.

In mehreren Pilzen ist der Anteil an methylverzweigten Fettsäuren höher als bei den genannten Bakterien, Käfern oder Pflanzen. Weitreichende Studien über die Fettsäurezusammensetzung verschiedener *Conidiobolus* Spezies wurden von Tyrell im Zeitraum von 1968 bis 1976 vorgenommen (Tyrell 1968) (Tyrell 1971) (Tyrell und Weatherstone 1976). Dabei wurden bis zu 73% methylverzweigte Fettsäuren identifiziert (Tyrell und Weatherstone 1976). Im Vergleich zu den Zygomycota ist der Anteil in Basidiomyceten wesentlich geringer. So wurden in *Laetiporus sulphureus* *i*15:0, *i*16:0 und *i*17:0 lediglich in Spuren nachgewiesen (Sinanoglou, et al. 2014). Bei *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma australe* und weiteren Ständerpilzen verhielt es sich ähnlich (Papaspayridi et al. 2013) (Ribeiro, et al. 2009) (Barros, et al. 2007) (Yilmaz, et al. 2006). Im Lipidextrakt des honiggelben Hallimasch (*Armillaria mellea*) wurden weniger als 10% methylverzweigte Fettsäuren nachgewiesen. Diese 10% beinhalteten 3,2% *i*14:0, 1,8% *i*15:0 und 0,7% *i*16:0. 14 weitere Pilze wurden untersucht, jedoch war der Anteil an den gesuchten Fettsäuren im honiggelben Hallimasch am höchsten (Rezanka und Mares 1987).

Nach der Identifizierung geeigneter Quellen für methylverzweigte Fettsäuren war es nötig, eine passende Synthesestrategie für die korrespondierenden Aldehyde zu

entwickeln und geeignete Enzyme zu finden, welche in der Literatur bereits Potential zur Umsetzung von Fettsäuren zeigten.

Eine Möglichkeit der biotechnologischen Darstellung von 12-Mtal wäre die Umsetzung von *i*15:0 mittels einer DOX.

Ebenso wäre es denkbar, aus *i*17:0 durch Umsetzung mit einer DOX 14-Methylpentadecanal zu generieren, welches wiederum mittels Aldehyddehydrogenase (ALDH) zu 14-Methylpentadecansäure (*i*16:0) umgesetzt würde. Eine erneuter Einsatz der DOX hätte 13-Methyltetradecanal als Produkt zu folge, das bei erneuter Verwendung der ALDH 13-Methyltetradecansäure (*i*15:0) als Produkt ergeben könnte. Im letzten Schritt bestünde die Möglichkeit, aus *i*15:0 mittels DOX 12-MTtal zu produzieren. Diese Variante wäre bei dem Vorkommen von relevanten Mengen an *i*17:0 denkbar, jedoch bedingt durch die vielen Stufen problematisch.

Die Entdeckung von weiteren methylverzweigten Fettsäuren in *B. subtilis*, unter anderem von 14-Methylpentadecansäure (*i*16:0) und 12-MTS (Kaneda 1963), lässt weitere Varianten der 12-MTtal-Produktion zu. So wäre bei Verwendung von *i*16:0 der Einsatz der DOX im ersten Schritt denkbar, im zweiten Schritt wäre die Umsetzung des generierten 13-Methyltetradecanals mittels ALDH zu *i*15:0 denkbar. Final würde *i*15:0 erneut mittels DOX zum gesuchten Produkt, 12-MTtal, biotransformiert. Allerdings wurde diese Syntheseroute nicht untersucht, da die Produktion der methylverzweigten Fettsäuren in *B. subtilis* über verschiedene, als Inhibitor fungierende, Zwischenprodukte führt (Willecke und Pardee 1971).

Seit 1999 sind mehrere Enzyme bekannt, welche die Oxidation von Fettsäuren zu 2-Hydroperoxiden katalysieren. Diesen α -Dioxygenasen (Hamberg, Sanz und Castresana 1999) (Hamberg, Ponce de Leon und Sanz, et al. 2002) (Koeduka, Matsui und Akakabe 2002) (Akakabe, Matsui und Kajiwarra 1999) wird eine Funktion als Verteidigungsmechanismus von Pflanzen gegen mikrobielle Infektionen zugeschrieben (Hamberg, et al. 2003) (Ponce de Leon, et al. 2002). Eine Steigerung der DOX-Aktivität in Tabak-Blättern wurde durch mechanisches Beschädigen der Blätter (drei- bis vierfache Steigerung) erreicht (Hamberg, Sanz und Castresana 2002); eine Steigerung der Expression in Pflanzen konnte auch durch Stimulation mit verschiedenen Substanzen beobachtet werden (de Leon, et al. 2002). Eine DOX-

Aktivität wurde auch in der Rattenleber nachgewiesen (Mihalik, Rainville und Watkins 1995). Bei der Gewinnung der Enzyme standen die Effektivität der katalysierten Reaktion und die Minimierung des Zeitaufwands im Vordergrund. Von Koeduka *et al.* (2005) wurden neun Tage alte Reis-Sämlinge zur Biotransformation eingesetzt, im Gegensatz dazu ist mit der hier gewählten heterologen Expression in *E. coli* eine Umsetzung bereits nach zwei Tagen (vgl. 2.8.1) möglich. Um einen kostengünstigen Prozess zu etablieren, wurde Lysat der *E. coli*-Zellen verwendet.

Außerdem wurden DOX in weiteren Organismen entdeckt, so zum Beispiel in der Grünalge *Ulva pertusa* (Akakabe, Matsui und Kajiware 1999); weitere Veröffentlichungen befassen sich mit dem Enzym in Bohnen und Reis (Saffert, et al. 2000) (Koeduka, Matsui und Akakabe 2002).

Bei der Umsetzung von Ölen mittels DOX aus der Grünalge *Ulva pertusa* wurden unter anderem Pentadecanal und (8Z)-Heptadecanal als Produkte nachgewiesen (Akakabe, Matsui und Kajiware 1999). Analog dazu setzte die DOX aus *Physcomitrella patens* ein weites Spektrum an Fettsäuren um (Hamberg, Ponce de Leon und Rodriguez, et al. 2005). Eine Reihe von Fettsäuren (C₁₂ bis C₂₀) wurde als Substrat eingesetzt, wobei Palmitinsäure (C₁₆) als Substrat bevorzugt wurde. Von Hamberg *et al.* beobachteten ebenso eine erfolgreiche Umsetzung von Linolensäure mit einer rekombinanten DOX aus Tabak und deren Homologen aus *Arabidopsis* (Hamberg, Sanz und Castresana 2002). Weiterhin untersuchten Bannenberg *et al.* ein breites Substratspektrum mit DOX aus Tomaten (Sl α -DOX2) und *Arabidopsis* (At α -DOX2). Hier zeigte sich die erfolgreiche Umsetzung von C₁₄ bis C₃₀-Fettsäuren (Bannenberg, et al. 2009).

Die Wahl fiel zu Beginn auf die DOX aus Reis, da bereits von Koeduka *et al.* 2002 gezeigt wurde, dass verschiedene Fettsäuren – sowohl C_{16:0}, C_{18:0} als auch Linol- und Linolensäure mittels α -DOX aus Reis (*Oryza sativa*) oxidiert wurden, um anschließend spontan zu decarboxylieren. So entsteht aus der jeweiligen Säure der um ein Kohlenstoffatom verkürzte Aldehyd (Koeduka, Matsui und Akakabe 2002). Kaehne *et al.* nutzten die DOX bereits erfolgreich, um die Fettsäuren C_{14:0}, C_{12:0} und C_{10:0} zu den entsprechenden Aldehyden umzusetzen (Kaehne, Buchhaupt und Schrader 2011).

Pflanzliche DOX sind Häm-Proteine, welche konservierte katalytische Domänen beinhalten. Die Aminosäurereste, welche für das Binden des Häm-Rings (His-167 und His-397) und die Oxidation (Tyr-389) verantwortlich sind, wurden 1998 von Sanz *et al.* untersucht. Sie sind in allen pflanzlichen DOX konserviert (Sanz, Moreno und Castresana 1998). Für die DOX aus Reis zeigte sich, dass Arg-559 notwendig für die Bindung des Substrates am aktiven Zentrum des Enzyms ist. Des Weiteren wird die Fettsäure durch His-311 im aktiven Zentrum gebunden, der α -Kohlenstoff der Fettsäure richtet sich dadurch unter Tyr-379 aus (Koszelak-Rosenblum, et al. 2008).

Wegen der Wechselwirkung am aktiven Zentrum des Enzyms, welche sich primär auf die Carboxylgruppe beschränkt (Zhu, Koszelak-Rosenblum und Malkowski 2013), lag die Vermutung nahe, dass die Generierung von Aldehyden aus methylverzweigten Fettsäuren mittels Dioxygenasen möglich sein sollte. Diese Hypothese konnte bestätigt werden, da die jeweiligen Aldehyde aus den eingesetzten methylverzweigten Fettsäuren gewonnen wurden (vgl. 2.11.1). Auch konnten Tridecanal und Pentadecanal aus linearen Fettsäuren hergestellt werden. Sowohl der Vergleich der Massenspektren und der Retentionsindizes mit der Literatur (Dickshaft 2005) (Guth und Grosch 1993) (Luo, et al. 2010), als auch mit Standards (Berdague, et al. 1991) (Choi 2003) bestätigten die Ergebnisse. Die entsprechenden Blindwerte der Biotransformation (2.11.1.2) zeigten keine Umsetzung.

Der höchste Umsatz wurde mit DOX aus *Cyaanocethe* sp. und 14-Methylpentadecansäure als Substrat erzielt. Zu vergleichbaren Erkenntnissen kam bereits Hamberg mit einer anderen DOX in 2005, jedoch handelte es sich dabei um lineare Fettsäuren, welche zum jeweiligen Aldehyd reagierten (Hamberg, Ponce de Leon und Rodriguez, et al. 2005). Ein Jahr später wurde durch Liu *et al.* die bevorzugte Oxidation von linearen Fettsäuren mit 16 bis 18 Kohlenstoffatomen durch die DOX aus *Arabidopsis thaliana* bestätigt (Liu, et al. 2006).

In früheren Veröffentlichungen (Zhu, Koszelak-Rosenblum und Malkowski 2013) wurde gezeigt, dass DOX verschiedene Co-Faktoren, wie z.B. NADH oder H₂O₂, benötigen, um die jeweiligen Substrate umzusetzen. Aufgrund des Vorkommens der notwendigen Co-Faktoren in den *E. coli*-Zellen wurde versucht, die Umsetzungen mittels eines Zellextraktes zu erzielen. Die Versuche gelangen, was in qualitativen Aktivitätsnachweisen (2.11.1) gezeigt werden konnte. Eine Isolierung des Enzyms wurde deswegen nicht in Betracht gezogen. Zusätzlich erwies sich die Steigerung

der Durchlässigkeit der Membranen durch Lyophilisation der Zellen, welche das Austreten des Enzyms erleichtert, als hilfreich (R. Chen 2007) (Jones 1999). Ebenso schützt das Lyophilisieren die Enzyme vor Denaturierung (Carpenter, et al. 1997) und weiteren Veränderungen durch reaktive Spezies, da die Reaktionsraten in getrocknetem Zustand drastisch verringert werden (Pikal 1990 a) (Pikal 1990 b) (Pikal 1994). In vielen Veröffentlichungen werden Additive genannt, welche die Enzyme während der Gefriertrocknung stabilisieren können (Wang, et al. 2009) (Chefson, Zhao und Auclair 2007) (Allison, et al. 1999) (Souillac, et al. 2002). Im Gegensatz dazu wurde bei einer extrazellulären Fructosyltransferase (FTase, EC 2.4.1.9) gezeigt, dass solche Additive die Aktivität nicht signifikant beeinflussten (Aguiar-Oliveira und Maugeri 2013). In Studien von Cao trat sogar eine Abnahme der Enzymaktivität bei Zugabe von Additiven auf (Cao 2005). Deshalb wurde die Lyophilisation der DOX ohne Zusätze untersucht. Die Ausbeuten deuten darauf hin, dass eine Lyophilisation der DOX auch ohne weitere Reagenzien, welche die Struktur des Enzyms stabilisieren, möglich ist. Es ist allerdings nicht ausgeschlossen, dass die Umsatzraten durch Optimierung der Gefriertrocknung noch erhöht werden könnten.

Schilling *et al.* optimierten die Aktivität einer Carotinoid-spaltenden Dioxygenase (CCD) aus *Arabidopsis thaliana* durch Zugabe verschiedener Detergentien (Schilling, Haetzelt, et al. 2008) (Schilling, Patett und Schwab 2007). Den Reaktionsansätzen wurden Substanzen zugesetzt, welche sowohl die Löslichkeit des Enzyms als auch der Substrate verbessern. Hierbei stellte sich Cholsäure als optimaler Lösungsvermittler heraus – was bei der Nutzung der DOX jedoch nicht in Einklang mit dem Substrat zu bringen gewesen wäre: Es sollten Säuren zu den korrespondierenden C_{n-1} -Aldehyden umgesetzt werden. Als weiterer potenter Emulgator für die Umsetzung von langkettigen Substraten durch Enzyme wurde Triton[®] X-100 verwendet (Schilling, Haetzelt, et al. 2008). Die Fettsäure wird durch Zusatz von 1% Triton[®] X-100 effizient emulgiert und umgesetzt (Kaehne *et al.* 2011), was in dieser Arbeit bestätigt wurde.

Im direkten Vergleich der Umsetzung von linearen und methylverzweigten Fettsäuren durch die DOX aus Reis zeigten sich bei linearen Fettsäuren höhere Ausbeuten an Aldehyden. Die Ergebnisse der Umsetzungen mit den linearen Fettsäuren stehen in Einklang mit den von Kaehne *et al.* (2011) erzielten Ergebnissen. Die

methyilverzweigten Fettsäuren verhielten sich bei der Biotransformation mittels DOX anders: So waren die höchsten Ausbeuten bei der Umsetzung von Fettsäuren mit längeren Kohlenstoffresten zu beobachten. Die DOX aus Reis setzte alle getesteten Fettsäuren um, jedoch verlief die Umsetzung von 14-Methylpentadecansäure zu 13-Methyltetradecanal am effizientesten (Abbildung 26). Die Umsetzung von 13-Methyltetradecansäure zu dem Aroma, welches für den charakteristischen Geruch von gekochtem Fleisch verantwortlich ist, 12-MTal (Guth und Grosch 1993), erreichte nach einer Stunde lediglich ca. 15%, nach 3 h 34% Umsatz. Die DOX aus *Cyanothece* sp. zeigte eine höhere Effizienz - die Umsätze der gleichen Säure mit dieser DOX betrugen nach einer Stunde bereits 40%. Lineare Fettsäuren wurden nach 3 h bis zu 76% zum Aldehyd umgesetzt. Im Vergleich dazu wurden die verzweigten Fettsäuren besser zu den jeweiligen C_{n-1} Aldehyden biotransformiert - die Umsätze betrugen 65% (12-Methyltetradecanal) bis 95% (13-Methyltetradecanal). Die DOX aus *Cyanothece* sp. transformiert somit methyilverzweigte Fettsäuren besser als die DOX aus Reis. Die DOX aus *Cyanothece* sp. erreichte eine höhere Bildung von 12-MTal nach 3 h (76%) als die DOX aus Reis (34%). Beim Substrat 15:0 handelt es sich um eine ungeradzahlige Fettsäure, welche nur in geringen Mengen in verschiedenen Organismen zu finden ist (Kaneda 1977) (Rezanka und Mares 1987) (Papaspayridi, et al. 2013) (Sinanoglou, et al. 2014). Es wurde untersucht, ob der Aldehyd, welcher die Methylgruppe am benachbarten Kohlenstoffatom trägt (11-MTal), ähnliche Geruchseindrücke hervorruft. Dieser wurde bislang noch nicht als Aromastoff mit fleischigem und würzigem Geruchseindruck beschrieben.

Das Erfassen der olfaktorischen Eindrücke (2.16.2) gestaltete sich für einige Substanzen schwierig. Die methyilverzweigten Tetradecanale wurden nicht wahrgenommen. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass diese Verbindungen ein höheres Molekulargewicht aufweisen, was wiederum eine geringere Flüchtigkeit bedingt. So beträgt der Siedepunkt von 12-Methyltetradecanal zum Beispiel 291,5 °C (Werkhoff, Brennecke, et al. 1993). Den methyilverzweigten Tridecanalen konnte jedoch ein würziger Geruch attestiert werden. Es zeigte sich, dass 12-MTal den Eindruck von Fleisch- oder Suppenwürze wesentlich stärker und charakteristischer hervorrief als 11-MTal. 11-MTal konnte nur eine leichte Note dieses Eindruckes erwecken. Die Standards, welche jeweils in gleichen Konzentrationen zur olfaktorischen Messung verwendet wurden, bestätigten diese

Eindrücke. Die bisherigen Arbeiten, in welchen 12-MTal als Hauptkomponente des Aromas von Fleisch nachgewiesen wurden (Guth und Grosch, 12-Methyltridecanal, a Species Specific Odorant of Stewed Beef 1993) (Kerscher, et al. 2000) (Guth und Grosch 1995) (Dannenberger, et al. 2006) (Werkhoff, Bruening, et al. 1993), bestätigten diesen Sachverhalt. Die anderen gewonnenen Aldehyde zeigten entweder keinen charakteristischen Geruchseindruck oder lediglich einen chemischen Geruch (vgl. Tabelle 38).

In dieser Arbeit wurden methylverzweigte Aldehyde erstmals mittels Umsetzung durch Dioxygenasen generiert. Hierbei handelte es sich um zwei geruchsaktive Verbindungen, welche als Aroma verwendet werden könnten. Da 12-MTal als Hauptaromakomponente in verschiedenen tierischen Erzeugnissen vorkommt (Guth und Grosch 1993) und somit maßgeblich zu dessen Aroma beiträgt, wurde versucht, einen alternativen Weg zu finden, um natürliches Fleischaroma herzustellen.

Eine Umsetzung von $\dot{1}5:0$ zu 12-MTal wurde erstmals gezeigt. Um die Produktion von natürlichem 12-MTal zu gewährleisten, musste jedoch auf andere Enzyme zurückgegriffen werden, da 13-Methyltetradecansäure ($\dot{1}5:0$) aus natürlichen Quellen lediglich in sehr geringen Mengen zur Verfügung steht. Allerdings machen $\dot{1}4:0$, $\alpha 15:0$ und $\dot{1}6:0$ bis zu 50% des Gesamtfettsäuregehaltes in *Conidiobolus denaeosporus* aus (Tyrell 1968) (Tyrell 1971) (Tyrell und Weatherstone 1976). Für weitere Experimente sollte der Pilz *Conidiobolus heterosporus* verwendet werden, da in diesem Pilz hohe Gehalte an methylverzweigten Fettsäuren vorkommen. Die von Tyrell (1968) beschriebenen Ausbeuten an methylverzweigten Fettsäuren konnten mit 29,5% $\dot{1}4:0$, 11,3% $\alpha 15:0$, 6,9% $\dot{1}6:0$ und 0,8% $\alpha 17:0$ in dieser Arbeit bestätigt werden (2.20.2, vgl. Abb. 48). In Summe wurden im Fettextrakt von CHET-N, vergleichbar mit den Werten von Tyrrell, ca. 50% methylverzweigte Fettsäuren bestimmt. Im Einklang mit Tyrells Ergebnissen steht auch das Auftreten von geradzahligen *iso*-Fettsäuren und ungeradzahligen *anteiso*-Fettsäuren (Tyrell und Weatherstone 1976). Um eine höhere Ausbeute an *iso*-Fettsäuren mit gerader Anzahl von Kohlenstoffatomen zu erreichen, ist eine Supplementierung mit L-Valin in Betracht zu ziehen (Kaneda 1963) (Kaneda 1966).

Bereits 1993 wurde von Arfmann und Abraham gezeigt, dass es möglich ist, verschiedene aromatische Carbonsäuren mittels biotechnologischer Verfahren zu reduzieren. Als Biokatalysatoren wurden 20 Kulturen, hauptsächlich Pilze,

verwendet. Die Organismen wurden zusammen mit den jeweiligen Säuren im Kulturmedium inkubiert. Die Versuchsdauer für die Umsetzung von aromatischen Carbonsäuren variierte zwischen 48 und 192 h. Hauptprodukt der einzelnen Umsetzungen war der korrespondierende Alkohol der unterschiedlichen Säuren. Bei der Umsetzung von Ferulasäure hingegen detektierten Arfmann und Abraham außer Coniferylalkohol (6,9%) noch 13,1% an Coniferylaldehyd (Arfmann und Abraham 1993). Primär wurde hier die Bildung von unterschiedlichen Alkoholen festgestellt, Nebenprodukte kamen in geringen Mengen vor. Somit ist davon auszugehen, dass die jeweiligen Aldehyde, ausgenommen die Umsetzung von Ferulasäure, in diesem Versuchsaufbau von den ausgewählten Organismen maximal als Nebenprodukte bzw. in geringen Mengen gebildet wurden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Nutzung des kompletten Organismus ebenso untersucht. Problematisch bei den Ansätzen von Arfmann und Abraham ist die Biokatalyse im Kulturmedium, da Substanzen im Kulturmedium die Analytik stören. Ein weniger komplexes Umsetzungsmedium erleichtert die Erfassung von potentiellen Transformationsprodukten erheblich.

Für die Produktion von natürlichem 12-Methyltridecanal wurden verschiedene Carbonsäure-Reduktasen (Akhtar, Turner und Jones 2013) (He, Li, et al. 2004) in Betracht gezogen, welche den Aldehyden aus den jeweiligen methylverzweigten Fettsäuren generieren. Das Potential der Carbonsäure-Reduktasen wurde zuerst mittels Ganzzellkatalyse untersucht, um die Kosten für die Herstellung von 12-Methyltridecanal möglichst gering zu halten. Analog der Versuchsdurchführung von Akhtar (2013) - jedoch mit dem Unterschied, dass das hier verwendete Plasmid keine Hydrogenase beinhaltete - wurde 12-Methyltridecansäure für 24 h inkubiert (2.17). Bei diesen Versuchen wurde lediglich eine Umsetzung zu 12-Methyltridecanol detektiert, analog zu den Versuchen von Arfmann und Abraham (vgl. 2.17) (Arfmann und Abraham 1993). Auch bei der Untersuchung des zeitlichen Verlaufes der Bildung von 12-Methyltridecanol zeigte sich 12-Methyltridecanal nur in Spuren. Die Blindwerte der Ganzzellkatalyse mit leerem Plasmid pET28a (2.17.3) zeigten eine Umsetzung von 12-Methyltridecanal zu 12-Methyltridecanol, während die Säure nicht umgesetzt wurde. Somit ist es wahrscheinlich, dass 12-Methyltridecanal durch endogene Enzyme der *E. coli*-Stammes weiter zum Alkohol reduziert wurde (2.17.1). Dennoch konnte eine Umsetzung von methylverzweigten Fettsäuren durch die Oxidoreduktase aus *Nocardia* sp. (Stamm 5646) indirekt nachgewiesen werden. Der

Alkohol ist durch Reduktion des Aldehyds entstanden. Hierbei wurde die Säure mit Hilfe der CARs zum Aldehyd reduziert, welcher weiter zum Alkohol 12-MTol reduziert wurde. Literaturbekannt sind bisher ausschließlich Biotransformationen von Säuren mit aromatischen Resten (Chen und Rosazza 1994) (Kato, H., et al. 1988) oder linearen Resten (Akhtar, Turner und Jones 2013), die Biotransformation von methylverzweigten Fettsäuren wurde noch nicht gezeigt.

Da die Reduktion mit Hilfe von CAR im Ganzzellsystem nicht auf der Stufe des Aldehyds stoppte, wurde versucht, die Reduktion mit isoliertem Enzym zu erreichen. Weil die verwendeten Enzyme jeweils einen Polyhistidin-Tag (His-Tag) trugen, erfolgte die Aufreinigung der Enzyme mit Hilfe einer Nickel-Affinitätschromatographie (2.8.3) (vgl. Abbildung 22). Messungen der Konzentration der einzelnen Proteinfractionen wurden mittels Bradfordassays durchgeführt. Die Ansätze wurden 24 h inkubiert, da nach diesem Zeitraum ein rapider Abfall der Aktivität für die CAR aus *Mycobacterium marinum* eintritt (Akhtar, Turner und Jones 2013).

Mit der Reduktion von Undecansäure zu Undecanal durch die aktivierte CAR aus *Mycobacterium marinum* wurden die von Akhtar et al. (2013) gezeigten Resultate reproduziert. Ebenso gelang die Umsetzung von 12-Methyltridecansäure (Abbildung 31). Durch Abgleich mit den Standardsubstanzen mittels Retentionszeit und Massenspektrum wurden die Transformationsprodukte eindeutig identifiziert.

Neben dem o.g. Enzym standen noch weitere CARs zur Verfügung: Eine aus *Mycobacterium marinum* und eine CAR aus *Nocardia* sp., welche nicht durch eine Phosphopantethein-Transferase aktiviert wurden. Alle drei Enzyme waren in der Lage, 12-Methyltridecansäure mit unterschiedlicher Effizienz zu 12-Methyltridecanal umzusetzen. Beispielsweise war durch die aktivierte CAR aus *Mycobacterium marinum* eine Produktbildung von bis zu 26% möglich (vgl. Abbildung 44). Im Vergleich dazu lieferte die nicht aktivierte CAR aus *Mycobacterium marinum* maximal 4,5% (vgl. Abbildung 45), was sich mit der fehlenden Aktivierung zum *holo*-Enzym erklären lässt (Venkitasubramanian, Daniels und Rosazza 2007) (Mootz, Schörgendorfer und Marahiel 2002). Dass mit der CAR aus *Nocardia* sp. ein Umsatz von lediglich 5,2% erzielt wurde (vgl. Abbildung 42), könnte ebenso an der fehlenden Aktivierung durch die Phosphopantethein-Transferase liegen. Zudem ist ein anderes Substratspektrum des Enzyms denkbar, welches bereits in der Literatur durch Chen et al. (1994) und Kato (1988) beschrieben wurde: eine erfolgreiche Umsetzung wurde

nur bei aromatischen Resten erreicht. Für eine Steigerung der Ausbeuten wäre die mehrfache Extraktion mit organischem Lösungsmittel denkbar. Ebenso könnte die Verwendung von Triton[®] X-100, wie bei den Ansätzen mit DOX, zu einer besseren Umsetzung (schlechte Löslichkeit der Fettsäuren bedingt durch den lipophilen Rest) des Substrates beitragen und dadurch die Umsatzraten erhöhen.

Die Kinetik zeigte, dass die Inkubationszeit nicht länger als 2 h betragen muss. Nach diesem Zeitpunkt war kein nennenswerter Anstieg der 12-Methyltridecanalkonzentration erkennbar. Die Blindwerte bestätigten, dass die Umsetzung durch das Enzym erfolgte.

Für die Produktion von natürlichem 12-Methyltridecanal sollte eine Lipase verwendet werden, um möglicherweise als Triacylglycerid (TAG) gebundene Säuren freizusetzen und so dem Enzym bereitzustellen.

Mit verschiedenen Modellsubstanzen wurde die Lipase auf ihr Potential hin untersucht, gebundene 12-Methyltridecansäure aus dem nach 2.11.9.5 gewonnenen Lipidextrakt freizusetzen. Eine hohe Aktivität zeigte sich bei der Freisetzung von Octansäure (8:0) und einer der 12-MTS ähnlichen Säure, Hexadecansäure (16:0) (vgl. Abbildung 47). Da verschiedene Säuren, auch solche mit einem längerem Kohlenstoffrest als 12-MTS, durch die Lipase abgespalten wurden, wäre es möglich, 12-MTS durch die Lipase aus *Candida rugosa* aus dem Lipidextrakt freizusetzen. Dies konnte in folgenden Experimenten bestätigt werden (vgl. 2.20.3). Nach dieser Umsetzung der Lipidextrakte wurden verschiedene Aldehyde detektiert - welche jedoch nicht quantifiziert wurden. Akhtar konnte die Umsetzung der Säuren von C₆ bis C₁₈ mit der CAR zeigen (Akhtar, Turner und Jones 2013). In der hier vorgelegten Arbeit wurde erstmalig die Reduktion von methylverzweigten Fettsäuren demonstriert. 12-MTAl stellte den größten Peak im Chromatogramm (Abbildung 50) dar, da das Edukt mit 29,5% im Lipidextrakt vertreten war. Tetradecanal wurde als Umsetzungsprodukt identifiziert; das Edukt Tetradecansäure war mit 7,8% im Lipidextrakt nachweisbar. Ebenso konnte 12-Methyltetradecanal detektiert werden. Die Vorstufe des durch die Reduktion mittels CAR gewonnenen 12-Methyltetradecanals, die 12-Methyltetradecansäure kam mit 11,3% im Fettextrakt vor. Somit wäre es eine Option, eine CAR in eine mehrstufige Reaktionskaskade *in vitro* einzubauen, um neue Verfahren für die natürliche Produktion von 12-MTAl zu ermöglichen (Finnigan 2016). Das Auftreten von geringen Mengen an 12-MTAl trotz

fehlender Lipase in den Negativkontrollen ohne Lipase lässt sich durch bereits frei vorliegende 12-MTS bei einem pH = 7,5 in einem 50 mM Phosphatpuffer erklären (vgl. Abbildung 53). Mit Hilfe der Extraktion des in Puffer emulgierten Lipidextraktes mit *n*-Hexan wurden die TAG aus der Lösung entfernt. Der Extrakt wurde nach 2.11.9.6 behandelt (Abbildung 52). Nach dem Entfernen des organischen Lösungsmittels wurde die wässrige Phase auf einen pH = 2 eingestellt, um die Extraktion der freien Säuren mit *n*-Hexan zu ermöglichen. Anschließend wurde der Extrakt nach 2.11.9.6 behandelt. Ein Teil der Säuren lag frei in der wässrigen Phase vor (Abbildung 53). Die Rückextraktion mit organischem Lösungsmittel war hier notwendig, um die Lewis-Säure BF₃ nicht zu hydrolysieren - sie steigert die Nucleophilie des Carbonyl-Kohlenstoffatoms. Nach gaschromatographischer Analyse konnte 12-MTS (als Methylester) in beiden Fraktionen identifiziert werden. Dieser Sachverhalt erklärte das Auftreten von 12-MTal nach Einsatz der CAR in dem Ansatz ohne Lipase, da ein Teil der 12-MTS bereits frei im Lipidextrakt vorlag.

Die Herstellung von 12-MTal wäre auch in einer Ganzzellkatalyse denkbar, jedoch stört hier derzeit noch die sehr hohe Reduktase-Aktivität des *E. coli* BL21(DE3)-Stammes die Bildung des Aldehyden als Hauptprodukt. Dies steht in Einklang mit von Kunjapur *et al.* in 2015 veröffentlichten Ergebnissen (Kunjapur und Prather 2015) (Kunjapur, Tarasova und Prather 2014). Dies wäre möglich, indem man die jeweiligen Gene der endogenen Hydrogenase des *E. coli* Stammes entfernt (Kunjapur, Tarasova und Prather 2014). Es wäre laut Hodgman und Jewett denkbar, die Umsetzung in kommerziellen Maßstäben zu tätigen (Hodgman und Jewett 2012) (Schwartz 2012).

Zusammenfassung und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es, eine Möglichkeit aufzuzeigen, natürliches 12-Methyltridecanal biotechnologisch zu generieren. 12-Methyltridecanal gilt als Hauptaromakomponente (*character impact compound*) von hitzebehandeltem Rindfleisch. Bisher konnte nur durch chemische Synthese gewonnenes 12-Methyltridecanal in Brühwürzen und Instantgerichten verwendet werden. Ob ähnliche Moleküle einen vergleichbaren Geruchseindruck vermitteln, wurde hier ebenso untersucht.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die biotechnologische Umsetzung von methylverzweigten Fettsäuren durch verschiedene Enzyme - sowohl mittels Ganzzellkatalyse als auch mit aufgereinigtem Enzym - gelingt. Durch Ganzzellkatalyse mit dem *E. coli*-Stamm BL21(DE3), welcher das Plasmid pET-28a(+)- α -DOX *Cyanotheca* sp. beinhaltet, konnten aus methylverzweigten Fettsäuren die jeweiligen Aldehyde gewonnen werden. Hierbei wurde unter Verwendung von Triton[®] X-100 und lyophilisierten Zellen eine maximale Ausbeute von 94% (13-Methyltetradecanal) bereits nach 3 h erreicht. Des Weiteren wurden erstmals die Kováts-Indices folgender Substanzen bestimmt: 13-Methyltetradecanal, 12-Methyltetradecanal, 11-Methyltridecanal, 11-Methyldodecanal und 10-Methyldodecanal.

Als potentes Enzym für die Produktion von 12-Methyltridecanal stellte sich eine Carbonsäurereduktase (CAR) aus *Mycobacterium marinum* mit aktivierender Phosphopantetheinyl-transferase (PPT) aus *Bacillus subtilis* heraus. So zeigte die Biotransformation von 12-Methyltridecansäure durch isolierte Carbonsäurereduktase aus *Mycobacterium marinum* mit aktivierender Phosphopantetheinyl-transferase aus *Bacillus subtilis* bereits nach 2 h bis zu 26% an 12-Methyltridecanal; längere Inkubationszeiten führten nicht zu gesteigerten Umsetzungen. Bei diesen Ansätzen wurde kein 12-Methyltridecanol detektiert, welches bei der Ganzzellkatalyse mit Zellpellets des BL21(DE3)-Stammes, der jeweils die einzelnen CAR-kodierenden Plasmide beinhaltet, das Hauptprodukt war. Im Zuge der Umsetzung der Lipide aus *Conidiobolus heterosporus* (CHET-N) mit isolierter Carbonsäurereduktase und Lipase aus *Candida rugosa* wurden 0,175 mM des gewünschten Zielproduktes generiert. Ebenso wurden weitere interessante Produkte wie 12-Methyltetradecanal bei dieser Umsetzung identifiziert.

Ein Stamm, welcher nur die Carbonsäurereduktase aus *Mycobacterium marinum* exprimierte, zeigte eine signifikant geringere Aktivität als der Stamm mit aktivierter Carbonsäurereduktase. Dies bestätigte, dass die Phosphopantetheinyl-transferase eine Aktivitätssteigerung der jeweiligen Carbonsäurereduktase zur Folge hatte. Eine Co-Expression der Carbonsäurereduktase aus *Nocardia spec.* mit einer Phosphopantetheinyl-transferase könnte zu höheren Ausbeuten bei Umsetzungen des Substrates führen.

Zur Optimierung der Produktion von natürlichem 12-Methyltridecanal wäre die Verwendung des Emulgators Triton® X-100 denkbar, um dem Substrat eine bessere Wechselwirkung mit dem aktiven Zentrum des Enzyms zu ermöglichen. Dies könnte die Ausbeute steigern und es für eine Übertragung auf den industriellen Maßstab interessant gestalten.

Um die Kosten zu reduzieren, wäre eine Anpassung der Co-Faktoren auf äquimolare Menge zu dem Substrat denkbar. Ebenso wäre eine Regeneration der jeweiligen Co-Faktoren denkbar. Evocatal hat hierfür zum Beispiel zwei Glucosedehydrogenasen (GDH; gdh280 und gdh060) im Sortiment, welche in der Lage sind, sowohl NADP^+ als auch NAD^+ zu NADPH , beziehungsweise NADH , unter Verbrauch von D-Glucose, zu regenerieren. Als Nebenprodukt wird dabei Gluconolacton gebildet (evocatal 2013).

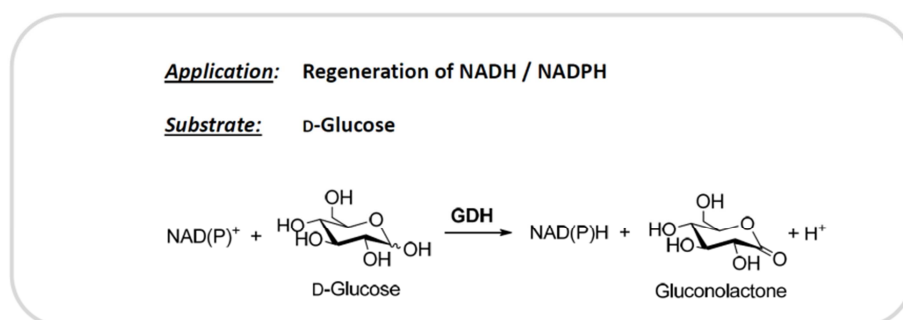


Abbildung 55: Regenerierung von NAD(P)^+ unter Verwendung von GDH mit D-Glucose;
aus evozymes (2013), S. 22

Alternativ könnte man eine Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD) nutzen, welche Glucose-6-Phosphat verwendet. Das Molekül muss allerdings zuvor durch eine Hexokinase aus Glucose und ATP hergestellt werden (Wichmann und Vasic-Racki 2005).

In dieser Arbeit wurde erstmals die enzymatische Reduktion von methylverzweigten Fettsäuren gezeigt. Mittels Dioxygenase (DOX) konnten 11-Methyltridecanal, 12-Methyltetradecanal, 13-Methyltetradecanal und 12-Methyltridecanal aus den jeweiligen korrespondierenden Säuren generiert werden. In einem Zeitraum von 3 h wurden über 50% der Fettsäuren umgesetzt (siehe Abbildung 27).

Erstmals wurde die Bildung von 12-Methyltridecanal durch die Reduktion von 12-Methyltridecansäure mittels Carbonsäurereduktase aus *Mycobacterium marinum* mit aktivierender Phosphopantetheinyl-transferase aus *Bacillus subtilis* gezeigt.

Ziel der Arbeit war die Produktion natürlichen 12-Methyltridecanals. Dies wurde mit der Nutzung von natürlichen Ressourcen gewährleistet. *Conidiobolus heterosporus* produzierte 29,5% an 12-MTS. Der Lipidextrakt wurde mit isolierter Carbonsäurereduktase aus *Mycobacterium marinum*, welche durch eine Phosphopantetheinyl-transferase aus *Bacillus subtilis* aktiviert wurde, inkubiert. Als weiterer Zusatz der Eintopfreaktion diente eine Lipase aus *Candida rugosa*, um die gebundenen Fettsäuren freizusetzen. Nach 2 h wurde bereits eine Umsetzung von $0,175 \text{ mM} \pm 0,003 \text{ mM}$ an 12-Methyltridecanal, der Hauptaromakomponente von gekochtem Rindfleisch, erreicht.

Literatur

- Aguiar-Oliveira, E. und Maugeri, F.; "Effects of lyophilization on catalytic properties of immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. LEB-V10." *Food Bioprod. Process.*, 2013, 91 ed.: 609-616.
- Aiking, H., de Boer, J. und Vereijken, J.; "Sustainable protein production and consumption. pigs or peas?" *Springer*, 2011, 45 ed.: 193-215.
- Akakabe, Y.; Matsui, K. und Kajiwara, T.; "Enantioselective α -hydroperoxylation of long-chain fatty acids with crude enzyme of marine green alga *Ulva pertusa*." *Tetrahedron Lett.*, 1999, 40 ed.: 1137-1140.
- Akhtar, M.K.; Turner, N.J. und Jones, P.R.; "Carboxylic Acid Reductase is a versatile enzyme for the conversion of fatty acids into fuels and chemical commodities." *PNAS*, 2013, 110 ed.: 97-92.
- Allison, S. D.; Chang, B.; Randolph, T. W. und Carpenter, J. F.; "Hydrogen bonding between sugar and protein is responsible for inhibition of dehydration-induced protein unfolding." *Arch. Biochem. Biophys.*, 1999, 365 ed.: 289-298.
- Arbeitsgruppe "Aromastoffe" und "Stabilisotopenanalytik" in der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, "Herkunft und Authentizität von Vanillearomen." *Lebensmittelchemie*, 2010: 1-11.
- Arfmann, H. A. und Abraham, W. R.; "Microbial reduction of aromatic carboxylic acids." *Z. Naturforsch.*, 1993, 48c ed.: 52-57.
- Asselineau, J. und Lederer, E.; "Chemistry and metabolism of bacterial lipides." K.Bloch (ed.), *Lipide metabolism*, John Wiley & sons, New York. , 1960, 52 ed.: 337-406.
- Bannenberg, G. *et al.*; "Functional analysis of alpha-DOX2, an active alpha-dioxygenase, critical for normal development in tomato plants." *Plan. Physiol.*, 2009, 151 ed.: 1421-1432.
- Barros, L.; Baptista, P.; Correia, D. M.; Morais, J. S. und Ferreira, I. C. F. R.; "Effects of conservation treatment and cooking on the chemical composition and oxidant activity of portugese wild edible mushrooms." *J. Agric. Food Chem.*, 2007, 55 ed.: 4781-4788.
- Berdague, J. L.; Denoyer, C.; Quere J. Le und Semon, E.; "Volatile components of dry-cured ham." *J. Agric. Food Chem.*, 1991, 7 ed.: 1257-1261.
- Binder, T.P.; "Enzymatic method of making aldehydes from fatty acids." *US007491854*, 2009.
- Bochers, A.; Keen, C. L. und Gershwin, M. E.; "Mushrooms, tumors, and immunity: an update." *Bul. Exp. Biol. Med.*, 2004, 229 ed.: 393-406.

- Brooker, J. R.; "An evaluation of fish meat as an ingredient in hot dogs: Summary report." *National Marine Fisheries Service, Washington, D.C.*, 1985.
- Buchanan, R. E. und Gibbons, N. E.; "Bergey's manual of determinative bacteriology." *The William & Wilkins Co.*, 1974; 8 ed.: 531-550.
- Buckner, J. S.; "Cuticular polar lipids of insects. Insect lipids." *Insect Lipids: Chemistry, Biochemistry, and Biology*, 1993: 227-70.
- Burley, V.J.; Paul, A. W. und Blundell, J. E.; "Influence of a high-fibre food (mycoprotein) on appetite: effects on satiation (within meals) and satiety (following meals)." *AJCN*, 1993, 47 ed.: 409-418.
- Cao, L.; "Carrier-bound immobilized enzymes: Principles, Application and Design." *Wiley-VCH*, 2005.
- Carpenter, J. F.; Pikal, M. J.; Chang, B. S. und Randolph, T. W.; "Rational design of stable lyophilized protein formulations: some practical advice." *Pharm. Res.*, 1997, 14 ed.: 969-975.
- Chefson, A.; Zhao, J.; und Auclair, K.; "Sugar-mediated lyoprotection of purified human CYP3A4 and CYP2D6." *J. Biotechnol.*, 2007, 130 ed.: 436-440.
- Chen, R.R.; "Permeability Issues in whole-cell bioprocesses and cellular membrane engineering." *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, 74 ed.: 730-738.
- Chen, Y. und Rosazza, J.P.N.; "Microbial transformation of ibuprofen by a nocardia species." *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, 60 ed.: 1292-1296.
- Cheng, W.; Zheng, X. und Yang, M.; "Hydrogen Peroxide induced Protein Oxidation during Storage and Lyophilization Process." *J. Pharm. Sci.*, 2016, 105 ed.: 1837-1842.
- Choi, H.S.; "Character impact odorants of *Citrus Hallabong* [(*C. unshiu* Marcov x *C. sinensis* Osbeck) x *C. reticulata* Blanco] cold-pressed peel oil." *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51.: 2687-2692.
- Clark, H. J.; "Chemistry Goes Green." *Nat. Chem.*, 2009, 1 ed.: 12-13.
- Dannenberger, D.; Lorenz, S.; Nuernberg, G.; Scollan, N.; Ender, K. und Nuernberg, K.; "Analysis of fatty aldehyde composition, including 12-Methyltridecanal, in plasmalogens from *Longissimus* muscle of concentrate- and pasture-fed bulls." *J. Agric. Food Chem.*, 2006, 54 ed.: 182-188.
- Daron, H. H.; "Nutritional alteration of the fatty acid composition of a thermophilic *Bacillus* species." *J. Bacteriol.*, 1973, 116 ed.: 1096-1099.
- de Carvalho, C.; "Enzymatic and whole Cell Catalysis: Finding new Strategies for old Processes." *Biotechnol. Adv.*, 2011, 29.: 75-83.

- de Leon, I. P.; Sanz, A.; Hamberg, M. und Castresana, C.; "Involvement of the Arabidopsis alpha-DOX1 fatty acid dioxygenase in protection against oxidative stress and cell death." *The Plant J.*, 2002, 29.: 61-72.
- Denny A.; Aisbitt, B. und Lunn, J.; "Mycoprotein and health." *Nutr. Bull.*, 2008, 33 ed.: 298-310.
- Deutscher Verband der Aromenindustrie e. V.; "Woher kommt Vanillin und wie stellt man es her?"
http://aromenverband.de/wp-content/uploads/2016/02/fact_sheets_vanillin.pdf, 2016.
- Dickshaft, J. S. *et al.*; "Volatile organic compound from arctic bacteria of the cytophaga-flavobacterium-bacteroides group: a retrobiosynthetic approach in chemotaxonomic investigations." *Chem. Biodiv.*, 2005, 2 ed.: 318-353.
- Diedrich, M. und Henschel, K. P.; "The natural occurrence of unusual fatty acids. I. Odd numbered fatty acids." *Mol. Nutr. Food Res*, 1990, 34 ed.: 935-943.
- Edelman, J.; Fewell, A. und Solomons, G.L.; "Myco-protein - a new food." *Nutr. Abstr. Rev.*, 1983, 53 ed.: 472-479.
- evocatal; "evozymes" 2013: 22.
- FAO; "The state of food agriculture - livestock in the balance.", 2009 b.
- Fellet, M.; "A Fresh Take on Fake Meat." *ACS Cent. Sci.*, 2015, 1 ed.: 347-349.
- Fiddler, W.; Pensabene, J. W.; Gates, R. A.; Hale, M.; Jahncke, M. und Babit J.K.; "Alaska pollock (*Theragra chalcogramma*) mince and surimi as a partial meat substitute in frankfurters: N-nitrosodimethylamine formation." *J. Food Sci.*, 1993 a, 70 ed.: 62-65.
- Fiddler, W.; Pensabene, J. W.; Gates, R. A.; Hale, M. und Jahncke, M.; "Investigations on N-nitrosodimethylamine formation in cooked frankfurters containing Alaska pollock (*Theragra chalcogramma*)." *J. Food Sci.*, 1991 b, 57 ed.: 569-571.
- Fiddler, W.; Pensabene, J.W.; Gates, R.A.; Jancke, M.L. und Hale, M.B.; "Atlantic Menhaden (*Brevoortia tyrannus*) mince and surimi as partial meat substitutes in frankfurters: effect on N-Nitrosamine formation." *J. Agric. Food Chem*, 1993 b, 41 ed.: 2238-2241.
- Finnigan, W.; "Carboxylic acid reductases and their use as well defined enzyme building blocks for the construction of in vitro cascade reactions." *N. Biotechnol.*, 2016, 33 ed.: 15-16.
- Fukushima, D.; "Recent Progress on Biotechnology of soybean proteins and soybean protein food products." *Food Biotechnol*, 1994, 8 ed.: 83-135.

- Fukushima, D.; Boca Raton, FL und Yada, RY; "Proteins in food- Soy proteins"
Proteins in food processing, CRC Press, 2004: 123-145.
- Gabelman, A. und Luzio, G.A.; "Enzymatic oxidation of alcohols in a continuous reaction system." *US005783429*, 1998.
- Galliard, T. und Matthew, J.A.; "The enzymic formation of long chain aldehydes and alcohols by alpha oxidation of fatty acids in extracts of cucumber fruit (*Cucumis sativus*)."
Biochim. Biophys. Acta., 1976, 1 ed.: 26-35.
- Gross, G.G. und Zenk, M.H.; "Reduktion aromatischer Säuren zu Aldehyden und Alkoholen im zellfreiem System; 1. Reinigung und Eigenschaften von Aryl-Aldehyde: NADP-Oxidoreduktase aus *Neurospora crassa*." *Eur. J. Biochem.*, 1969, 8 ed.: 413-419.
- Gross, G.G. und Zenk, M.H.; "Reduktion aromatischer Säuren zu Aldehyden und Alkoholen im zellfreiem System; 2. Reinigung und Eigenschaften von Aryl-Aldehyde: NADP-Oxidoreduktase aus *Neurospora crassa*." *Eur. J. Biochem.*, 1969, 8 ed.: 420-425.
- Guth, H. und Grosch, W.; "12-Methyltridecanal, a species specific odorant of stewed beef." *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 1993, 26 ed.: 171-177.
- Guth, H. und Grosch, W.; "Dependence of the 12-Methyltridecanal concentration in beef on the age of the animal." *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.*, 1995, 201 ed.: 25-26.
- Hamber, M.; Sanz, A.; Rodriguez, M.J.; Calvo, A. P. und Castresana, C.; "Activation of the fatty acid alpha-dioxygenase pathway during bacterial infection of tobacco leaves: formation of oxylipins protecting against cell death." *J. Biol. Chem.*, 2003, 278 ed.: 51796-51805.
- Hamberg, M.; Sanz, A. und Castresana C.; "alpha-Dioxygenase, a new enzyme in fatty acid metabolism." *International Congress Series*, 2002, 1233 ed.: 307-317.
- Hamberg, M.; Sanz, A. und Castresana C.; "Alpha-Oxidation of fatty acids in higher plants. Identification of a pathogen-inducible oxygenase (PIOX) as an alpha-Dioxygenase and biosynthesis of 2-hydroperoxylinolenic-acid." *J. Biol. Chem.*, 1999, 274 ed.: 24503-24513.
- Hamberg, M.; Ponce de Leon, I.; Sanz, A. und Castresana C.; "Fatty acid alpha-Dioxygenases." *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 2002, 68-69 ed.: 363-374.
- Hamberg, M.; Ponce de Leon, I.; Rodriguez, M. J. und Castresana, C.; "alpha-Dioxygenases." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, 338 ed.: 169-174.
- Hamilton, R. J.; "Waxes: chemistry, molecular biology and functions." *Dundee: The Oily Press*, 1995.

- He, A.; Li, T.; Daniels, L.; Fotheringham, I. und Rosazza, J.P.N.; "Nocarardia sp. Corboxylic Acid Reductase: cloning, expression, and characterization of a new aldehyde oxidoreductase family." *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004: 1874-1881
- Hodgman, C. E. und Jewett, M. C.; "Cell-Free synthetic biology: thinking outside the cell." *MEtab. Eng.*, 2012, 14 ed.: 261-269
- Hollmann, F.; Isabel, W.; Arends, K.; Buehler, A. und Schallmey, B.; "Enzyme-mediated oxidations for the chemist." *GREEN CHEM.*, 2011, 13 ed.: 226-265.
- Hudlicky, T. und Reed, J.W.; "Applications of biotransformations and biocatalysis to complexity generation in organic synthesis." *CHEM. SOC. REV.*, 2009, 38 ed.: 3117-3132.
- Huang, J. F. *et al*; "Therapeutic effect of *Pleurotus eryngii* cellulose on experimental fatty liver in rats." *Genet. Mol. Res.*, 2016, 15.: 1-8.
- Jones, M.N.; "Surfactants in membrane solubilisation." *Intl. J. P.*, 1999, 177 ed.: 137-159
- Joshi, V. K. und Kumar, S.; "Meat analogues: plant based alternatives to meat products - A review." *Intl. J. Food. Ferment. Technol.*, 2015, 5 ed.:107-119
- Juárez, P.; Chase, J. und Blomquist, G. J.; "A microsomal fatty acid synthetase from the integument of *Blattella Germanicas* synthesizes methyl-branched fatty acids, precursors to hydrocarbon and contact sex pheromone." *Arch. Biochem. Biophys.*, 1992, 293 ed.: 333-341.
- Kaehne, F.; Buchhaupt; M. und Schrader J.; "A recombinant alpha-dioxygenase from rice to produce fatty aldehydes using *E. coli*." *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 90 ed.: 989-995.
- Kalac, P.; "Chemical composition and nutritional value of european species of wild growing mushrooms: A review." *Food. Chem.*, 2009, 113 ed.: 9-16.
- Kaneda, T.; "Fatty acids of the genus bacillus: an example of branched-chain preference." *Bateriol. Rev.*, 1977, 41 ed.: 391-418.
- Kaneda, T.; "Biosynthesis of branched-chain fatty acids: IV. Factors affecting relative abundance of fatty acids produced by *Bacillus subtilis*." *Can.J. Microbiol.*, 1966, 12 ed.: 501-514.
- Kaneda, T.; "Fatty acids in the genus Bacillus II. Similarity in the fatty acid compositions of *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus*." *J. Bacteriol.*, 1968, 95 ed.: 2210-2216.
- Kaneda, T.; "Fatty acids in *Bacillus larvae*, *Bacillus lentimorbus* and *Bacillus popilliae*." *J. Bacteriol.*, 1969, 98 ed.: 143-146.

- Kaneda, T.; "Fatty acids in the genus *Bacillus*. I Iso- and anteiso-fatty acids as characteristic constituents of lipids in 10 species." *J. Bacteriol.*, 1967, 93 ed.: 894-903.
- Kaneda, T.; "Biosynthesis of branched chain fatty acids. I. Isolation and identification of fatty acids from *Bacillus subtilis* (ATC 7059)." *J. Biol. Chem.*, 1963, 238 ed.: 1222-1228.
- Kaneda, T.; "Biosynthesis of branched chain fatty acids. II. Microbial synthesis of branched long chain fatty acids from certain short chain fatty acid substrates." *J. Biol. Chem.*, 1963, 238 ed.: 1229-1235.
- Kaneda, T.; "Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance." *Microbiol. Rev.*, 1991, 55 ed.: 288-302.
- Kato, N.; Joung, E.H.; Yang, H.C.; Masuda, M.; Shimao, M. und Yanase, H.; "Purification and characterization of aromatic acid reductase from *Nocardia asteroides* JCM 3016." *Agric. Biol. Chem.*, 1991, 3 ed.: 757-762.
- Kato, N.; Konishi, H.; Uda, K.; Shimao, M. und Sakazawa, C.; "Microbial reduction of benzoate to benzylalcohol." *Agric. Biol. Chem.*, 1988, 57ed.: 1885-1886.
- Kerler, J.; Kohlen, E.; van der Vliet, A. und Winkel, C.; "Method for the enzymatical preparation of flavours rich in C6-C10 aldehydes." 2005: US6864072.
- Kerscher, R.; Nürnberg, K.; Voigt, J.; Schieberle, P. und Grosch, W.; "Occurrence of 12-Methyltridecanal in microorganisms and physiological samples isolated from beef." *J. Agric. Food Chem.*, 2000, 48 ed.: 2387-2390.
- Koeduka, T.; Matsui, K.; Kajiwara, Y. und Akakabe, T.; "Catalytic properties of rice alpha-oxygenase. A comparison with mammalian prostaglandin H synthases." *J. Biol Chem.*, 2002: 22648-22655.
- Koeduka, T.; Matsui, K.; Hasegawa, M.; Akakabe, Y. und Kajiwara, T.; "Rice fatty acid alpha-Dioxygenase is induced by pathogen attack and heavy metal stress: activation through jasmonate signaling." *J. Plant Physiol.*, 2005, 162 ed.: 912-920.
- Koeduka, T.; Matsui, K.; Akakabe, Y. und Kajiwara, T.; "Molecular characterization of fatty acid alpha-hydroperoxide-forming enzyme (alpha-alpha oxygenase) in rice plants." *Biochem. Soc. Trans.*, 2000: 765-768.
- Kolattukudy, P. E.; "Chemistry and biochemistry of natural waxes." *Elsevier Scientific Pub. Co.*, 1976.
- Koszelak-Rosenblum, M.; Krol, A. C.; Simmons, D. M.; Wroblewski, C. C.; Goulah, L. und Malkowski, M. G.; "His-311 and Arg-559 are key residues involved in fatty acid oxygenation in pathogen-inducible oxygenase." *J. Biological Chemistry*, 2008, 283 ed.: 24962-24971.

- Kunjapur, A. M. und Prather, K. L. J.; "Microbials engineering for aldehyde synthesis." *Appl. Environ. Microbiol.*, 2015, 81 ed.: 1892-1901.
- Kunjapur, A. M.; Tarasova, Y. und Prather, K. L. J.; "Synthesis and accumulation of aromatic aldehydes in an engineered strain of *E. coli*." *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, 136 ed.: 11644-11654.
- Carle, C.; "Pressemitteilung; Ritter Sport gegen Stiftung Warentest: Hohenheimer Lebensmittelwissenschaftler begrüßt Urteil im Schokoladenstreit." https://www.uni-hohenheim.de/pressemitteilung?tx_ttnews%5Btt_news%5D=18368&cHash=7913d10c53886584a976982a33cdb53c
- Li, T. und Rosazza, J.P.N.; "Purification, characterization and properties of an aryl aldehyde oxidoreductase from *Nocardia* sp. strain NRRL 5646." *J. Bacteriol.*, 1997, 179 ed.: 3482-3487.
- Li, T. und Rosazza, J.P.N., "NMR Identification of an acyl-adenylate intermediate in the aryl-aldehyde oxidoreductase catalyzed reaction." *J. Biol. Chem.*, 1998 272 ed.: 34230-34233.
- "List of prokaryotic names." 2017; <http://www.bacterio.net/bacillus.html>
- Liu, W. *et al*; "*Arabidopsis thaliana* fatty acid alpha-Dioxygenase-1: Evaluation of substrates, inhibitors and amino-terminal function." *Plant Physiol. Biochem.*, 2006, 44 ed.: 284-293.
- Lock, A. L. und Baumann, D. E.; "Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance milk fatty acids beneficial to human health." *Lipids*, 2004, 39 ed.: 1197-1206.
- Luo, C.; Zhang, W.; Sheng, C.; Zheng, C.; Yao, J. und Miao, Z.; "Chemical composition and antidiabetic activity of *Opuntia Milpa Alta* extracts." *Chem. Biodivers.*, 2010, 7 ed.: 2869-2879.
- McMichael, A. J.; Powles, J.W.; Butler, C. D. und Udaay, R.; "Food livestock production, energy, climate change and health." *Lancet*, 2007, 370 ed.: 1253-1263.
- Mihalik, S. J.; Rainville, A. M. und Watkins, P. A.; "Phytanic acid alpha-oxidation in rat liver peroxisomes." *Eur.J. Biochem.*, 1995, 232 ed.: 545-551.
- Miller, S.A. und Dwyer, J.T.; "Evaluating the safety and nutritional value of mycoprotein." *J. Food Sci*, 2001, 55 ed.: 42-47.
- Mootz, H.D.; Schörgendorfer, K. und Marahiel, M. A.; "Functional characterization of 4'-phosphopantetheinyl transferase genes of bacterial and fungal origin by complementation of *Saccharomyces cerevisiae* lys5." *FEMS Microbiol. Lett.*, 2002, 213 ed.: 51-57.

- Mottram, D. S.; "Flavour formation in meat and meat products: A review." *Food Chem.*, 1998, 62 ed.: 415-424.
- Papaspyridi, L. M.; Sinanoglou, V. J.; Strati, I. F.; Katapodis, P. und Christakopoulos, P.; "Fatty acid profiles of *Pleurotus ostreatus* and *Ganoderma australe* grown naturally and in a batch bioreactor." *Acta Aliment.*, 2013, 42 ed.: 328-337.
- Pikal, M. J.; "Freeze-drying of proteins. Part I: Process design." *BioPharm.*, 1990 a, 3 ed.: 18-28.
- Pikal, M. J.; "Freeze-drying of proteins. part II: Formulation election." *BioPharm.*, 1990 b, 3 ed.: 26-30.
- Pikal, M. J.; "Freeze-drying of proteins." Formulation and delivery of proteins and peptides, *BioPharm.*, 1994, 567 ed.: 120-133.
- Ponce de Leon, I.; Sanz, A.; Hamberg, M. und Castresana, C.; "Involvement of the *Arabidopsis* alpha-DOX1 fatty acid dioxygenase in protection against oxidative stress and cell death." *Plant J.*, 2002, 29 ed.: 61-72.
- Poucheret, P.; Fons, F. und Rapior, S.; "Biological and pharmalogical activity of higher fungi: 20-year retrospective analysis." *Mycology*, 2006, 27 ed.: 311-333.
- Poulos, A.; "Very long chain fatty acids in higher animals - A review." *Lipids*, 1995, 30 ed.: 1-14.
- Rezanka, T.; "Very-long-chain fatty acids from the animal and plant kingdoms." *Prog. Lipid Res.*, 1989, 28 ed.: 147-187.
- Rezanka, T.; und Sigler, K.; "Odd-numbered very-long-chain fatty acids from the microbial, animal and plant kingdoms." *Prog. Lipid Res.*, 2009, 48 ed.: 206-238.
- Rezanka, T. und Mares, P.; "Unusual and very long-chain fatty acids produced by basidiomycetes." *J. Chromatogr.*, 1987, 409 ed.: 390-395.
- Rezanka, T.; J. Cudlin and M. Podojil; "Very-long-chain fatty acids from lower organisms." *Folia Microbiol.*, 1987, 32 ed.: 149-176.
- Ribeiro, B.; Guedes de Pinho, P.; Andrade, P. B.; Baptista, P. und Valentao P.; "Fatty acid composition of wild edible mushrooms species: A comparative study." *Microchem. J.*, 2009, 93 ed.: 29-35.
- Ritter Sport; "<https://www.ritter-sport.de/blog/2014/09/09/erneuter-erfolg-im-schoko-streit-oberlandesgericht-weist-berufung-zurueck/>." 2014.
- Rodger, G.; "Production and properties of mycoprotein as a meat alternative." *Food-Technol-Chicago*, 2001, 55 ed.: 36-41.

- Rosazza, J.P.N.; and Li, T.; "Carboxylic acid reductase and methods for use of the same." 1998, US5795759
- Saffert, A.; Hartmann-Schreier, J.; Schon, A. und Schreier P.; "A dual function alpha dioxygenase-peroxidase and NAD(+) oxidoreductase active enzyme from germinating pea rationalizing alpha oxidation of fatty acids in plants." *Plant Physiol.*, 2000, 123 ed.: 1545-1552.
- Saito, K.; "Chromatographic studies on bacterial fatty acids." *J. Biochem.*, 1960, 47 ed.: 699-719.
- Sanz, A.; Moreno, J. I. und Castresana, C.; "PIOX, a new pathogen-induced oxygenase with homology to animal cyclooxygenase." *The Plant Cell*, 1998, 10 ed.: 1523-1537.
- Schilling, M.; Haetzelt, F.; Schwab, W. und Schrader, J.; "Impact of surfactants on solubilization and activity of the carotenoid cleavage dioxygenase, AtCCD1, in an aqueous micellar reaction system." *Biotechnol. Lett.*, 2008, 30 ed.: 701-706.
- Schilling, M.; Patett, F.; und Schwab W.; "Influence of the solubility-enhancing fusion proteins and organic solvents on the in vitro biocatalytic performance of the carotenoid cleavage dioxygenase AtCCD1 in a micellar reaction system." *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, 75 ed.: 829-838.
- Schwartz, J. R.; "Transforming biochemical engineering with cell-free biology." *AIChE Journal*, 2012, 58 ed.: 5-13.
- Sehgal, S. N.; Kates, M. und Gibbons, N. E.; "Lipids of *Halobacterium cutirubrum*." *Can. J. Biochem. Physiol.*, 1962, 40 ed.: 69-81.
- Shine, W.E. und Stumpf, P.K.; "Fat metabolism in higher plants." *Arch. Biochem. Biophys.*, 1974, 162 ed.: 147-157.
- Sinanoglou, V. J. *et al.*; "Lipid and fatty acid profile of the edible fungus *Laetiporus sulphureus*. Antifungal and antibacterial properties." *J. Food Sci. Technol.*, 2014, 52 ed.: 3264-3272.
- Souillac, P. O.; Constantino, H. R.; Middaugh, C. R. und Rytting, J. H.; "Investigation of protein/ carbohydrate interactions in the dried state. I. Calorimetric studies." *J. Pharm. Sci.*, 2002, 91 ed.: 206-216.
- Spiegel Online; "Schokoladenstreit: Ritter Sport siegt gegen Stiftung Warentest.", <http://www.spiegel.de/wirtschaft/service/aromen-streit-ritter-sport-gewinnt-gegen-stiftung-warentest-a-943171.html>, 2014
- statista.com.; <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/28782/umfrage/die-globale-fleischerzeugung-seit-1990/>, 2014

- Steinfeld, H. und Gerber, P.; "Livestock's long shadow. Environmental issues and option." *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, 2006.
- Stiftung Warentest; "Zum Reinbeißen." *Stiftung Warentest*, 2013, 12 ed.: 20-27.
- Süddeutsche Zeitung; "Schokolade bittersüß.",
<http://www.sueddeutsche.de/thema/Schokolade>, 2014
- taz Online; "Stiftung Warentest vs. Ritter Sport: Quadratisch, praktisch, erfolgreich.",
<http://www.taz.de/!5050947/>, 2014
- Transkript; "Quadratisch, praktisch, unnatürlich?" *Transkript*, 2014, 1-2 ed.: 10.
- Turnbull, W. H.; Leeds, A. R. und Edwards, G. D.; "Mycoprotein reduces blood lipids in free-living subjects." *Am. J. Clin. Nutr.*, 1992, 55 ed.: 415-419.
- Turnbull, W. H.; Walton, J. und Leeds, A. R.; "Acute effects of myco-protein on subsequent energy intake and appetite variables." *Am. J. Clin. Nutr.* 1993, 58 ed.: 507-512.
- Tyrell, D.; "Fatty acid composition of some *Entomophthoraceae* III." *Can. J. Microbiol.*, 1971, 17(8) ed.: 1115-1118.
- Tyrell, D.; "The fatty acid composition of some *Entomophthoraceae* II . *The occurrence of branched-chain fatty acids in Conidiobolus denaesporus Lipids*" *Can. J. Microbiol.* , 1968, 3(4) ed.: 368-372.
- Tyrell, D. und Weatherstone, J.; "The fatty acid composition of some *Entomophthoraceae* IV. The occurrence of branched-chain fatty acids in *Conidiobolus species*." *Can J Microbiol*, 1976, 22(7) ed.: 1058-1060.
- Venkatasubramanian, P.; Daniels, L.; und Rosazza J.P.N.; "Biocatalysis in the pharmaceutical and biotechnology industries." 2006, *CRC Press*, 1 ed.: 425-440.
- Vlaemenick, B.; Fievez, V.; Cabrita, A. R. J.; Fonseca, A. J. M. und Dewhurst, R. J.; "Factors affecting odd- and branched-chain fatty acids in milk: A review." *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2006, 131 ed.: 389-417.
- Walker, P.; Rhubart-Berg, P.; McKenzie, S.; Kelling, K. und Lawrence, R. S.; "Public Health implications of meat production and consumption." *Public Health Nutr.*, 2005, 8 ed.: 348-356.
- Wang, B.; Tchessalov, S.; Warne, N. W. und Pikal, M. J.; "Impact of sucrose level on storage stability of proteins in freeze-dried solids. I. Correlation of protein-sugar interaction with native structure preservation." *J. Pharm.*, 2009, 98 ed.: 31313-3144.

- Weerkamp, A. und Heinen, W.; "Effect of temperature on the fattyacid composition of the extreme thermophiles, *Bacillus caldolyticus* and *Bacillus caldotenax*." *J. Bacteriol.*, 1972, 109 ed.: 443-446.
- Werkhoff, P.; Bruening, J.; Emberger, R.; Guentert, M. und Hopp, R.; "Flavor chemistry of meat volatiles: new results on flavour components from beef, pork, and chicken." *Recent Development in Flavour Fragrance Chemistry, Proceedings of the International Haarman Reimer Symposium*, 1993: 183-213.
- Werkhoff, P.; Brennecke, S.; Bretschneider, W.; Güntert, M.; Hopp, R. und Surburg, H.; "Chirospecific analysis in essential oil, fragrance and flavor research." *Z Lebensm Unters Forsch.*, 1993, 196 ed.: 307-328
- Wheelock, V.; "Quorn: case study of a healthy food ingredient." *BRIT FOOD J*, 1993, 95 ed.: 40-44.
- Wichmann, R. und Vasic-Racki, D.; "Cofactor regeneration at the lab-scale." *Adv. Biochem. Engin./ Biotechnol.*, 2005: 225-260.
- Willecke, K. und Pardee, A. B.; "Fatty acid-requiring mutant of *Bacillus subtilis* defective in branched chain alpha-keto acid dehydrogenase." *J. Biol. Chem.*, 1971, 246 ed.: 5264-5272.
- Wongtangtintharn, S.; Iwasaki, H. und Toda, T.; "Effect of branched-chain fatty acids on fatty acid biosynthesis of human breast cancer cells." *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 2004, 50 ed.: 137-143.
- Yang, Y.; Shangpei, L.; Chen, X.; Huang, M. und Zheng, J.; "Induction of apoptotic cell death and in vivo growth inhibition of human cancer cells by a saturated branched-fatty acid, 13-Methyltetradecanoic-acid." *Cancer Res.*, 2000, 60 ed.: 505-509.
- Yao, M.; Walker, W. und Lillard, D. A.; "Fatty acids from vegetative cells and spores of *Bacillus stearothermophilus*." *J. Bacteriol.*, 1970, 102 ed.: 877-878.
- Yilmaz, N.; Solmaz, M.; Tükekul, I. und Elmastas, M.; "Fatty acid composition in some wild edible mushrooms growing in the middle Black Sea region of Turkey." *Food Chem.*, 2006, 99 ed.: 168-174.
- Yuasa, Y. und Haruki, T.; "Convenient synthesis of iso-methyl-branched long-chain aliphatic aldehydes, known to contribute significantly to meat flavour." *Flavour Fragr.*, 2004, 19 ed.: 199-204.
- Zhu, G.; Koszelak-Rosenblum, M. und Malkowski M.G.; "Crystal Structure of alpha-Dioxygenase from *Oryza sativa*: insights into a substrate binding and activation by hydrogen peroxide." *Protein Sci: a publication of the Protein-Society*, 2013, 22 ed.: 1432-1438.

Anhang

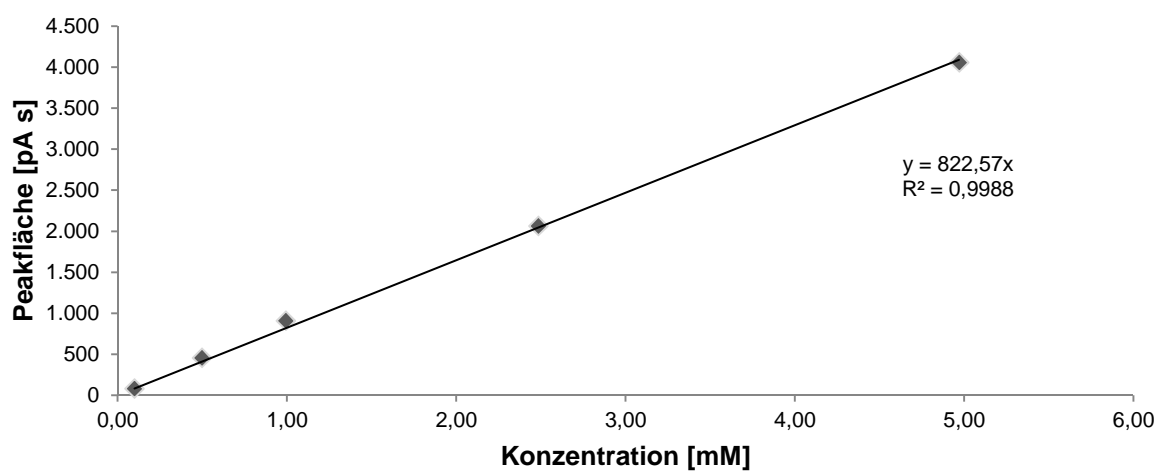


Abbildung 56: Kalibrierreihe für 12-Methyltetradecanal

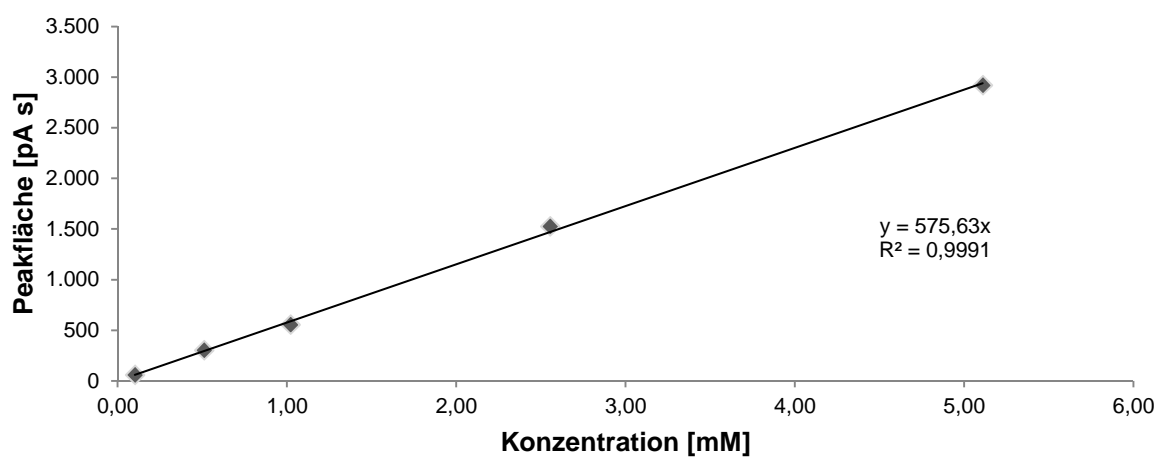


Abbildung 57: Kalibrierreihe für 12-Methyltridecanal

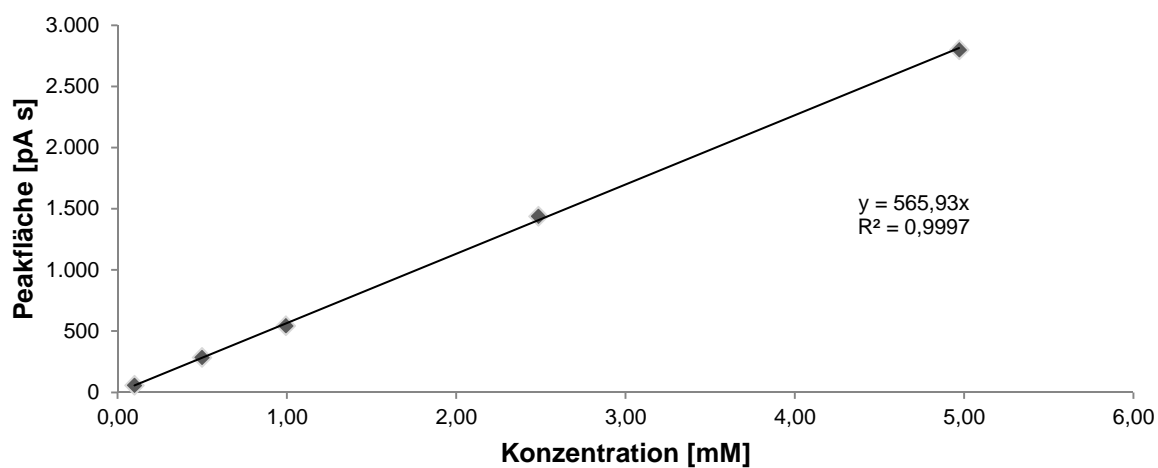


Abbildung 58: Kalibrierreihe für 13-Methyltetradecanal

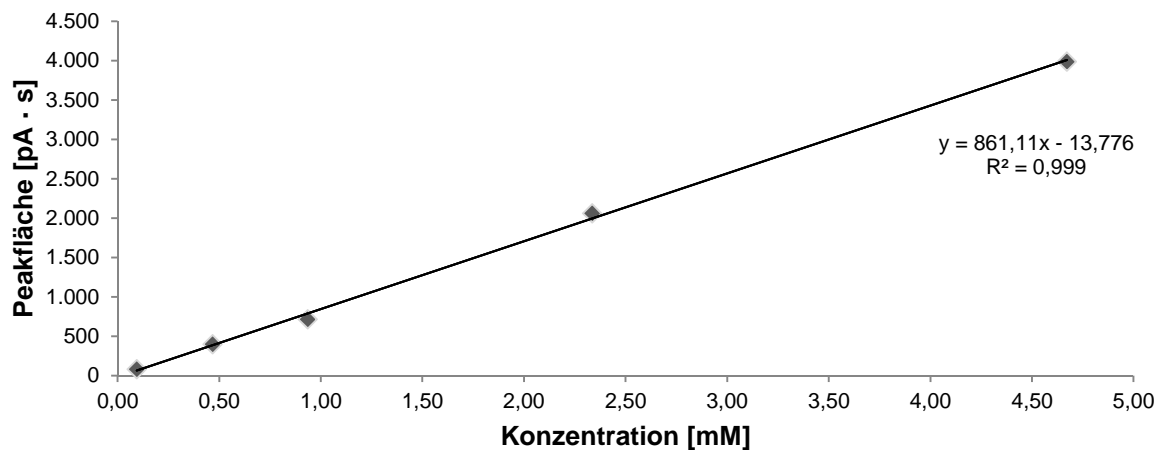


Abbildung 59: Kalibrierreihe für Pentadecanal

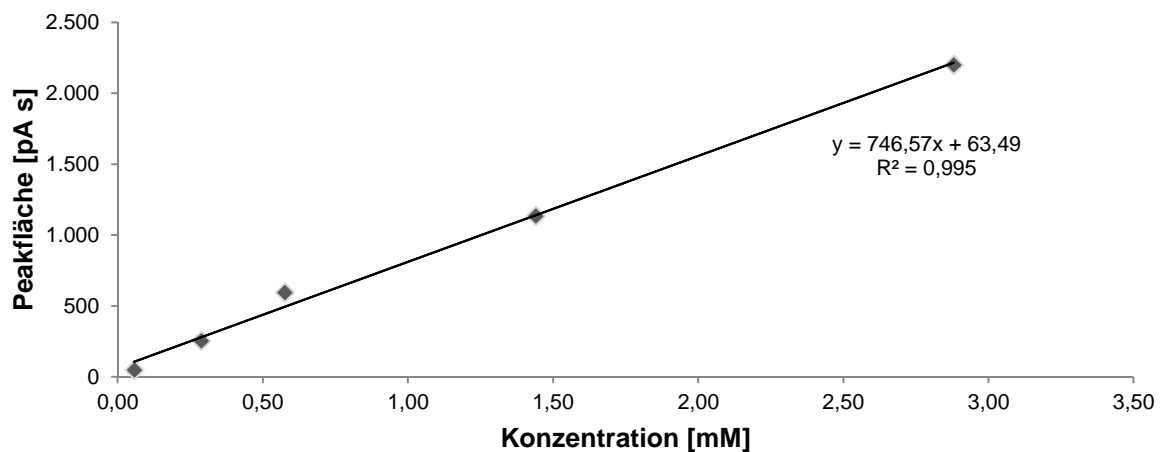


Abbildung 60: Kalibrierreihe zur Quantifizierung von Tridecanal

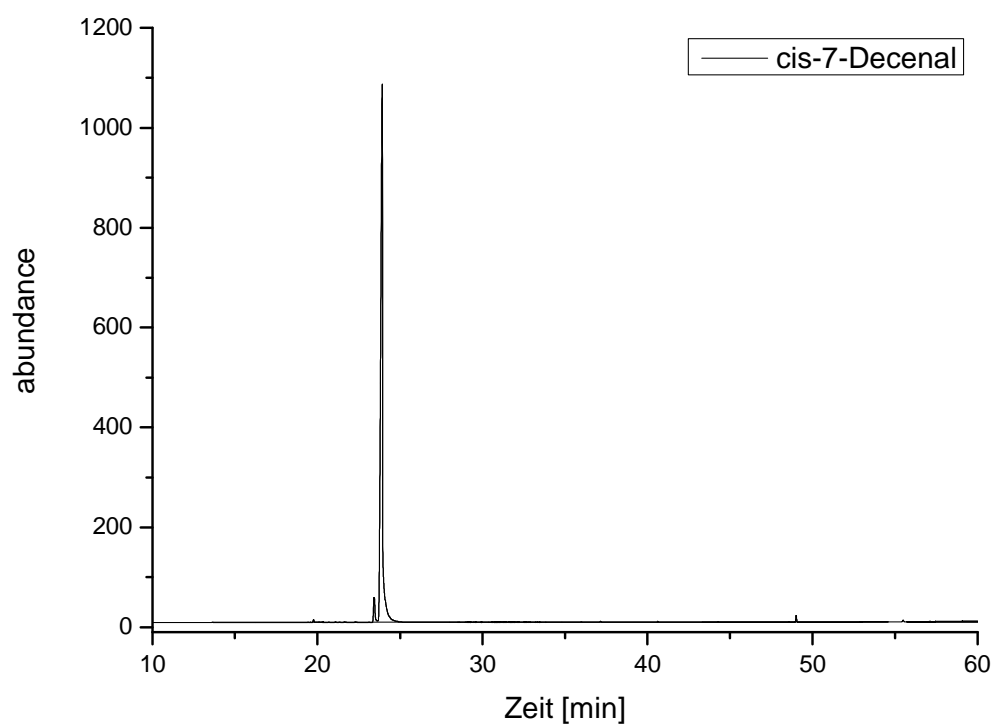


Abbildung 61: Chromatogramm der Substanz (Z)-7-Decenal, Standard; für Parameter siehe Tabelle 31

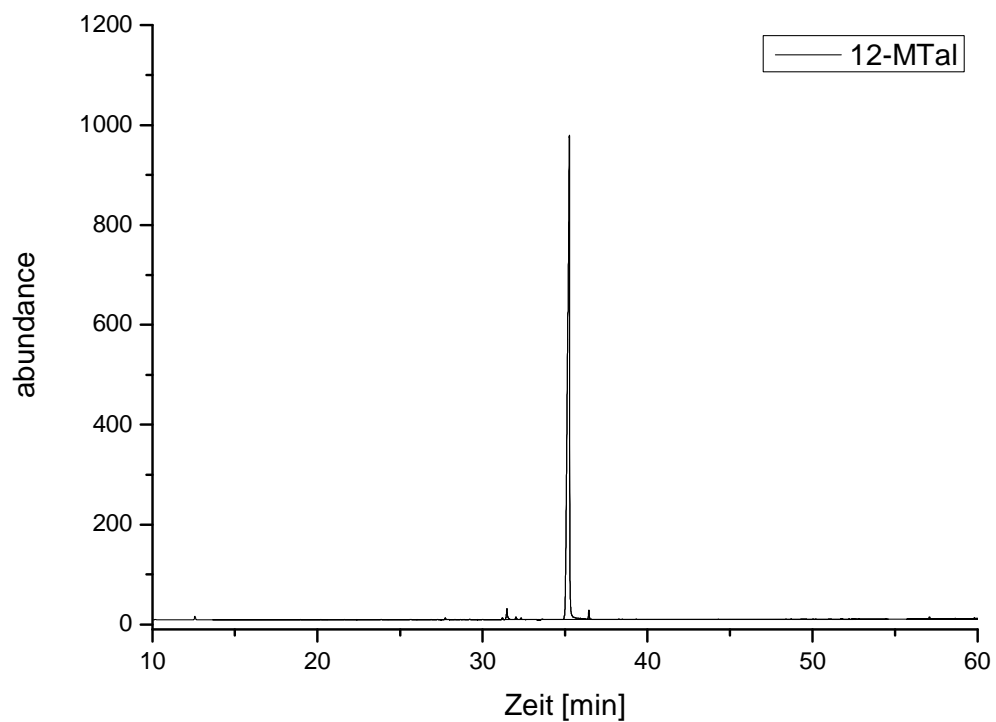


Abbildung 62: Chromatogramm der Substanz 12-MTol, Standard; für Parameter siehe Tabelle 31

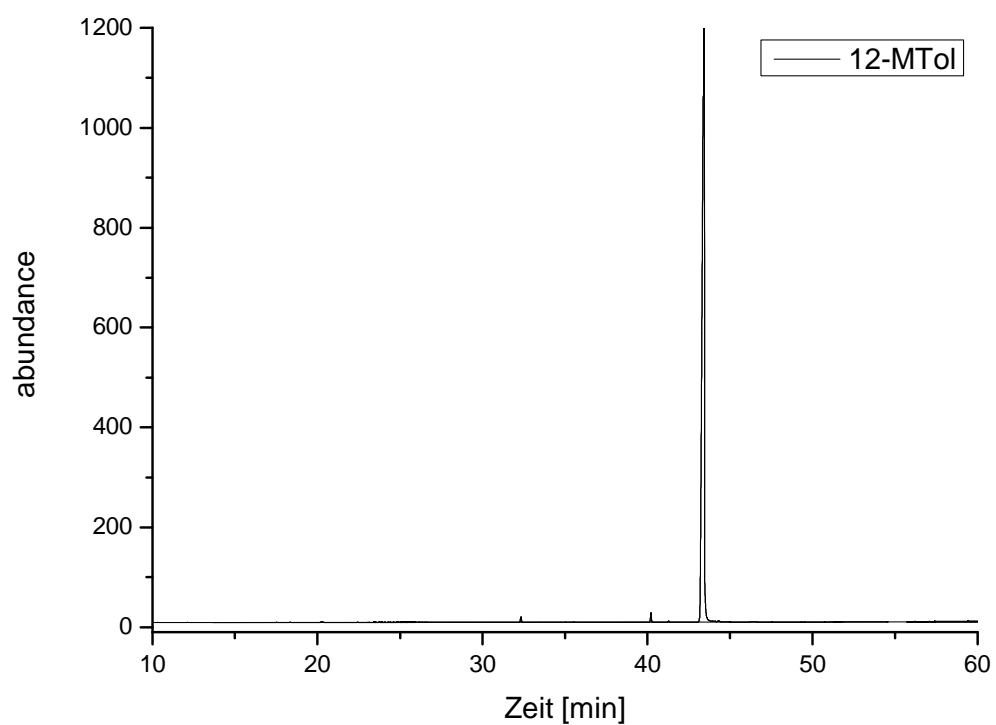


Abbildung 63:Chromatogramm der Substanz 12-MTol; für Parameter siehe Tabelle 31

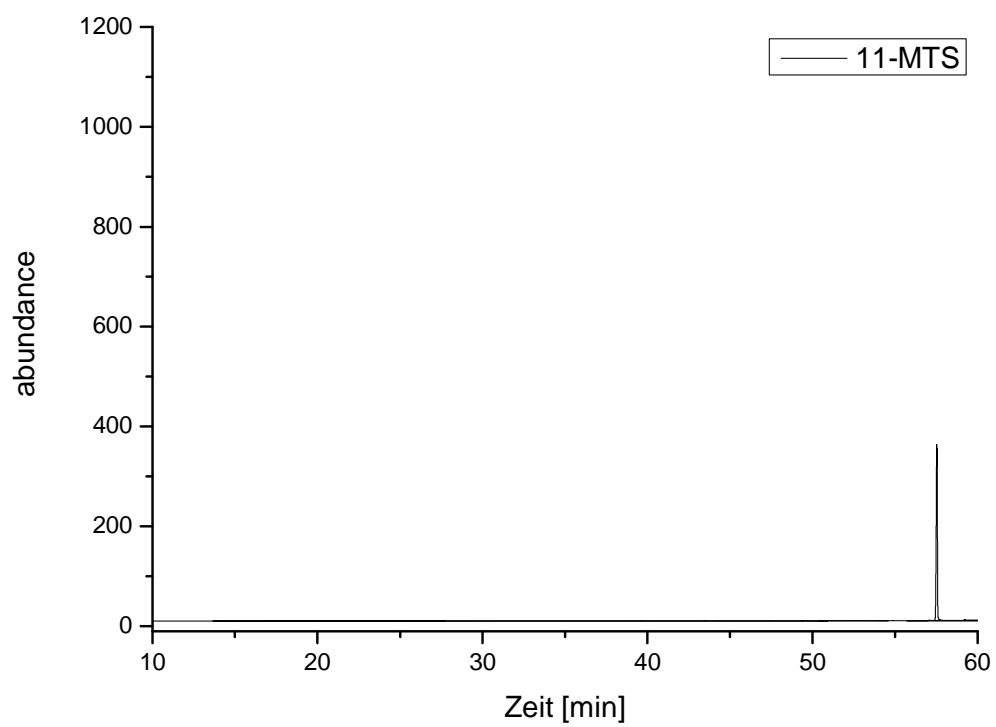


Abbildung 64: Chromatogramm der Substanz 11-MTS, Standard; für Parameter siehe Tabelle 31

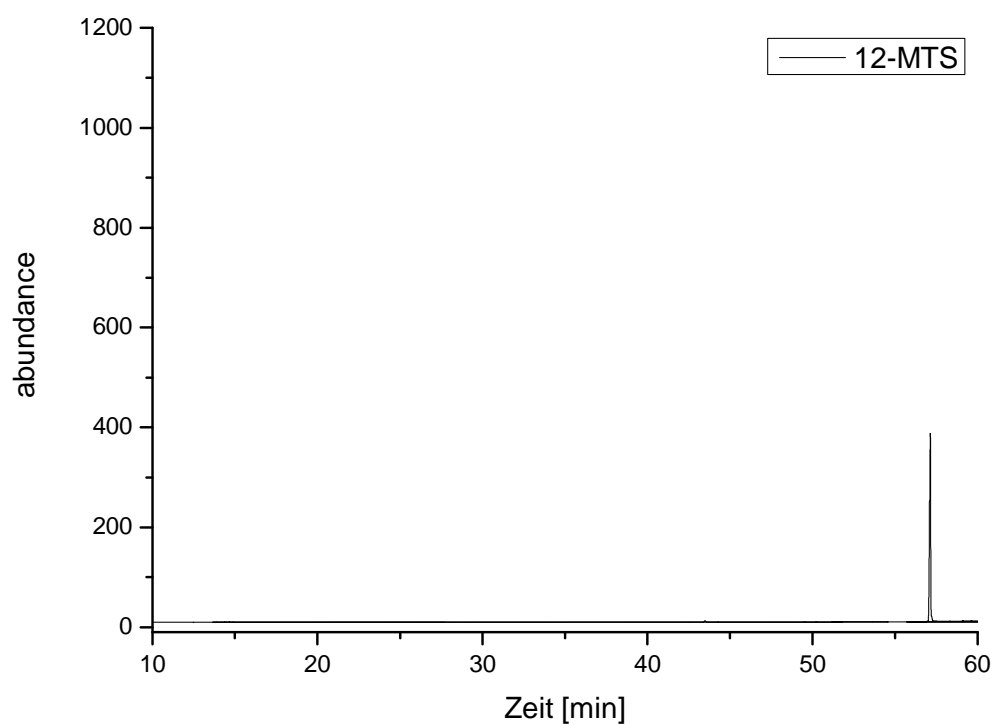


Abbildung 65: Chromatogramm der Substanz 12-MTS, Standard; für Parameter siehe Tabelle 31

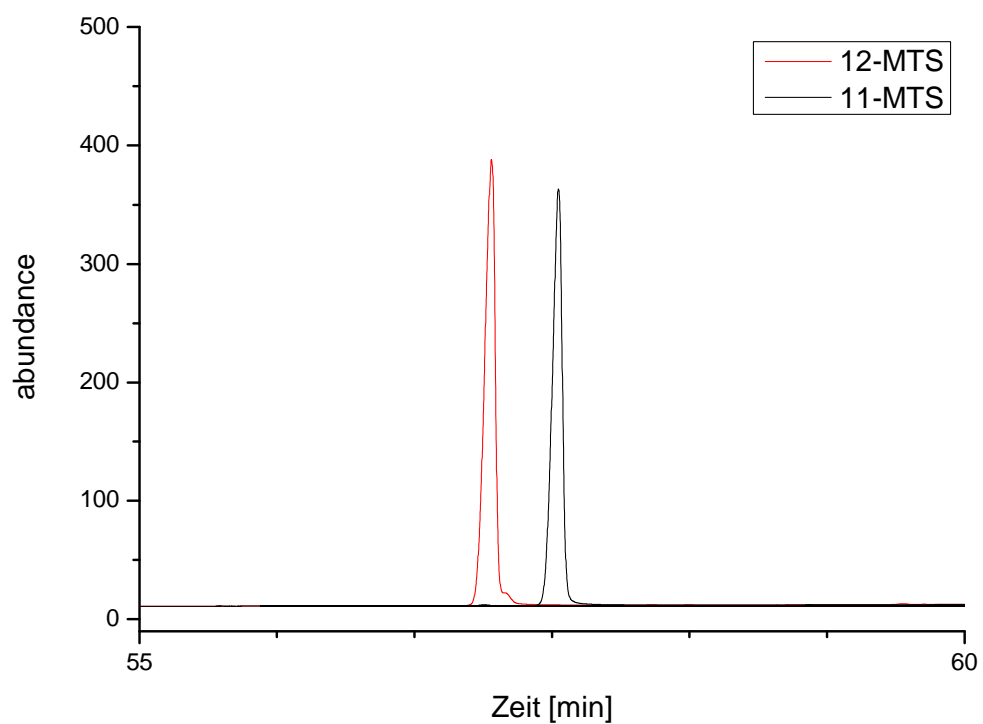


Abbildung 66: Überlagerungen der Chromatogramme von 11-MTS und 12-MTS, Standard; für Parameter siehe Tabelle 31